

FACULTÉ MIXTE
DE
MEDECINE GENERALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

Essai de mise au point et de normalisation
d'un TEST BIOLOGIQUE des SUBSTANCES FONGICIDES
et FONGOSTATIQUES de SYNTHÈSE
(Expérimentation sur le Méthyl Mercure Dicyan Diamide)

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine Générale et Coloniale
et de Pharmacie de Marseille

le Mercredi 23 Juin 1954

par **Geneviève DELTORT**
née **DOMINICI**

née à Marseille, le 16 Avril 1929

Pharmacien

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

MM. les Professeurs :

Examineurs de la Thèse	{	PELLISSIER, <i>Président du Jury</i>	{	<i>Assesseurs</i>
		BALANSARD		
		DELPHAUT		
		GREBUS		

Imprimerie MINERVA
20, La Canebière, 20
— MARSEILLE —

1954



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ MIXTE
DE
MEDECINE GENERALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

Essai de mise au point et de normalisation
d'un TEST BIOLOGIQUE des SUBSTANCES FONGICIDES
et FONGOSTATIQUES de SYNTHÈSE
(Expérimentation sur le Méthyl Mercure Dicyan Diamide)

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine Générale et Coloniale
et de Pharmacie de Marseille

le Mercredi 23 Juin 1954

par Geneviève DELTORT
née DOMINICI

née à Marseille, le 16 Avril 1929

Pharmacien

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

MM. les Professeurs :

Examineurs de la Thèse	{	PELLISSIER, <i>Président du Jury</i>	{	<i>Assesseurs</i>
		BALANSARD		
		DELPHAUT		
		GREBUS		

Imprimerie MINERVA
20, La Canebière, 20
— MARSEILLE —



PERSONNEL ENSEIGNANT

DE LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE GENERALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : G. MORIN

Assesseur : J. DELPHAUT

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs } MM. AUBARET, AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND,
Honoraire } GABRIEL, GAUJOUX, HECKENROTH, JOYEUX,
OLMER, RIMATTEI, ROCHE, ROGER.

Chargé de cours honoraire : M. TIAN

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : M^{lle} PERRIN

Professeurs

Anatomie	MM. GRISOLI
Anatomie Pathologique	GASTAUT
Bactériologie et Pathologie générale	BRAHIC
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Chimie Médicale	DERRIEN
Chimie Analytique et Hydrologie	ARNOUX
Chimie	DUMAZERT
Clinique Chirurgicale	FIOLLE
Clinique Chirurgicale	MOIROUD
Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédique	SALMON
Clinique Chirurgicale Thérapeutique et Chirurgie Expérimentale	de VERNEJOL
Clinique Dermato-Syphiligraphique	CHARPY
Clinique Exotique	BLANC
Clinique des Maladies du Système Nerveux	POURSINES
Clinique Médicale	MATTEI
Clinique Médicale	POINSO
Clinique Médicale Thérapeutique	OLMER J.
Clinique des Maladies des Voies Digestives et de la Nutrition	MONGES
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD
Clinique Neuro-Chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologique	CHOSSON
Clinique Urologique	CHAUVIN
Histologie	PICARD
Hygiène et Médecine Préventive	SAUTET
Matière Médicale	BALANSARD
Médecine Légale et Médecine du Travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie Chirurgicale	CARCASSONNE
Pharmacologie	MERCIER F.
Pharmacie Chimique et Toxicologie	VIGNOLI
Pharmacie Galénique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physique Médicale	DUBOULOZ
Thérapeutique	PIERI
Professeur sans Chaire	ROUX

Maîtres de Conférences Agrégés

MM. BOURRET, DONNET, GREBUS, MERCIER Jacques, MOURGUE.

Agrégés en exercice

MM. APPAIX, BERNARD, CREMIEUX, GRANJON, HENRY, JOUVE, LAMY,
LAVAL, LENA, MARONNEAUD, MONGES H., OLLIVIER, OURGAUD,
PAOLI, RAYBAUD, SERMENT, VAGUE.

Agrégés libres

MM. AUDIER, BERTHIER, DOR, FIGARELLA, IMBERT, RECORDIER.

Chargés des fonctions de Maîtres de Conférences

Anatomie Pathologique	M. PAYAN
Botanique et Cryptogamie	M. BERNARD P.
Histologie	M. STAHL

Chargé des fonctions d'Agrégé

Clinique Urologique M. CHAUVIN F.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A LA MÉMOIRE DE MES GRANDS-PÈRES

A MA MÈRE

A MES GRANDS-MÈRES

A MON MARI

A MES BEAUX-PARENTS

A MES ONCLES ET TANTES

A MES AMIS

A MES MAÎTRES

DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

HOMMAGE RESPECTUEUX

**Essai de mise au point et de normalisation
d'un TEST BIOLOGIQUE des SUBSTANCES FONGICIDES
et FONGOSTATIQUES de SYNTHÈSE**

(Expérimentation sur le Méthyl Mercure Dicyan Diamide)

INTRODUCTION

On sait tout l'intérêt que porte à l'heure actuelle, l'Agriculture à tous les moyens de lutte contre les Parasites des Plantes cultivées. Les Céréales, en effet, qui constituent la base de notre alimentation, sont susceptibles d'être envahies par des maladies fongiques (Rouille, Carie, Charbon), et ne peuvent être préservées de ces attaques que par un traitement anti-cryptogamique préventif. Dans ce but, la technique moderne a mis au point un certain nombre de substances Fongicides de synthèse, dont la plupart sont des Organo-Mercuriques, et qui, utilisés en général pour la désinfection des semences, ont donné des résultats satisfaisants.

Mais ces produits, d'une manipulation difficile, sont de plus, souvent toxiques pour l'homme et il est apparu comme essentiel de pouvoir les déceler dans les matières alimentaires où ils risquent de parvenir accidentellement, ou même, criminellement.

C'est pourquoi, guidés par notre Maître, Monsieur le Professeur PELLISSIER, nous avons décidé d'orienter nos travaux vers une recherche et un dosage de l'activité FONGICIDE et FONGOSTATIQUE par des Tests Biologiques précis et facilement réalisables en laboratoire. Qu'il nous soit donc permis d'adresser ici à Monsieur le Professeur PELLISSIER l'hommage de nos remerciements et de notre reconnaissance pour l'aide qu'il nous a apportée par ses conseils éclairés et son inlassable sollicitude. Notre plus grande joie est de le voir présider à la soutenance de notre thèse et nous tenons à l'assurer ici de notre infinie gratitude.

Nous tenons aussi à adresser nos remerciements respectueux à Monsieur, le Professeur BALANSARD pour l'aimable hospitalité qu'il a bien voulu nous consentir dans son Laboratoire, et à Monsieur le Professeur GREBUS auquel nous avons souvent fait appel pour vérifier certaines hypothèses du point de vue Bactériologique, et dont la patiente compétence ne s'est jamais démentie.

A Monsieur le Professeur DELPHAUT, qui a bien voulu juger ce travail, nous exprimons notre vive reconnaissance.

Pour la commodité de l'exposé, notre travail sera divisé en trois parties :

— le CHAPITRE I retracera un rapide exposé des connaissances réunies jusqu'à ce jour sur les Substances FONGICIDES et FONGOSTATIQUES, ainsi que des Méthodes de caractérisation et de Dosage qui leur ont déjà été consacrées..

— les CHAPITRES II et III exposeront notre travail personnel:

- le CHAPITRE II sera consacré aux techniques mettant en œuvre des ESPECES SAPROPHYTES ;
- le CHAPITRE III exposera les techniques mettant en œuvre un CHAMPIGNON ANAEROBIE (forme LEVURE).

DEFINITIONS

Il convient tout d'abord de définir clairement des termes que nous seront appelés à employer souvent au cours de cet exposé. C'est ainsi que :

— par FONGICIDE, il faut entendre des substances largement utilisées en Agriculture et qui doivent tuer les Champignons parasites ou empêcher la germination des spores ; détruire les Bactéries ou arrêter leur développement ⁽¹⁾ sans manifester d'action phytocide. En outre, ils doivent adhérer aux plantes, avoir une stabilité suffisante et être enfin non toxiques. (Nous verrons que cette dernière condition n'est pas toujours réalisée).

Il n'est pas inutile de signaler qu'outre-Atlantique, le vocable «FONGICIDE» paraît céder la place au terme nouveau de «FONGI-TOXIQUE» (Fongitoxic), chaque fois qu'il s'agit de désigner une substance douée de propriétés toxiques pour les Champignons, sans tenir compte du mode d'action. Ceci pour éviter l'ambiguïté qui peut se rapporter au terme de « FONGICIDE » sens large et étroit. (16),

⁽¹⁾ Les produits FONGICIDES, en effet, sont le plus souvent également BACTERICIDES. C'est ce que l'on peut appeler « l'action Bactéricide liée ».

— par FONGOSTATIQUE, il faut entendre une substance capable d'inhiber la formation ou la maturation des spores ou conidies qui assurent la dissémination de l'espèce. De sorte que nous nous trouvons bien en présence d'une colonie du Champignon envisagé, mais d'une colonie stérile, incapable de reconstituer les diverses étapes du cycle vital. Le processus de multiplication asexuée est inhibé.

Une autre définition des FONGOSTATIQUES tend à se baser sur l'inhibition du développement mycélien au lieu de l'arrêt de formation des spores. Mais de récentes expériences, ainsi que des opinions autorisées telles que celle émise par TREFOWL N. H. dans « LA PENICILLINE » (MASSON Editeur), nous permettent de n'en faire état que pour mémoire et d'arrêter notre choix à la précédente définition.

Qu'il nous soit permis d'ouvrir ici une parenthèse faisant état du parallélisme qui existe entre FONGICIDES et ANTIBIOTIQUES. Nous trouvons, en effet, en 1947, sous la plume de WAKSMAN, cette définition :

« Toute substance chimique produite par un microorganisme, ayant la propriété d'inhiber la croissance et même de détruire les Bactéries et autres microorganismes d'une manière spécifique, est un ANTIBIOTIQUE » (7).

Définition que WAKSMAN a lui-même modifiée et complétée en 1951 de la façon suivante :

« Un ANTIBIOTIQUE est une substance chimique produite par des microorganismes, qui a le pouvoir d'inhiber la croissance et même de détruire les Bactéries et autres microorganismes en solutions diluées ».

On voit donc ici la parenté qui existe entre FONGICIDES et ANTIBIOTIQUES BACTERICIDES, à cette différence près que les FONGICIDES sont généralement d'origine synthétique.

Il faut noter cependant que la CHLOROMYCETINE par exemple, qui est, sans conteste, un ANTIBIOTIQUE et qui, à l'origine, a été découverte dans le milieu de culture du STREPTOMYCES VENEZUELAE, est à l'heure actuelle uniquement préparée par synthèse.

On voit donc la complexité de tels problèmes et la difficulté qu'il y a à établir une définition rigoureuse, tant la séparation entre chaque classe est ténue et les exceptions nombreuses.

CHAPITRE I

LES SUBSTANCES FONGICIDES ET FONGOSTATIQUES DE SYNTHÈSE

Les connaissances acquises jusqu'à ce jour sur les Substances FONGICIDES et FONGOSTATIQUES se résument et se divisent en 2 groupes :

I. — Des recherches axées vers une augmentation de l'activité par modification de la Formule, exposé qui sera suivi d'une rapide nomenclature des principaux FONGICIDES utilisés à l'heure actuelle ;

II. — Rappel des méthodes actuelles de caractérisation et de mesure des FONGICIDES.

I. - L'Activité Fongicide, ses rapports avec la formule chimique. - Nomenclature des principaux dérivés utilisés.

Les FONGICIDES de Synthèse prenant à l'heure actuelle une importance grandissante, d'importantes études leur ont été consacrées, tendant à augmenter leur activité par une modification, parfois minime, de leur formule. Et, sans entrer dans le détail des techniques expérimentales, nous donnons ici un aperçu des résultats auxquels ces recherches ont abouti :

On sait maintenant que :

- une substitution en Para plutôt qu'en Ortho ou Meta
- un NH^4 quaternaire
- un Chlorophénol
- 2 ou 3 Radicaux à chaîne alliphatique courte
- 1 ou 2 Radicaux à poids moléculaire élevé

augmentent l'activité FONGICIDE dans des proportions considérables qui peuvent parfois varier du simple au double (14).

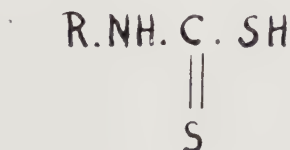
Il s'en suit que ces indications seront précieuses dans le choix du FONGICIDE à employer : on choisira de préférence celui qui présentera une ou plusieurs des caractéristiques précitées.

D'ailleurs, les composés FONGICIDES organiques de synthèse connus et utilisés jusqu'à ce jour appartiennent aux groupements chimiques les plus variés. Nous nous proposons d'en dresser ici, à titre de rappel, une rapide nomenclature.

Nous trouvons successivement : (17)

— **LES DERIVES DE L'ACIDE DITHIOCARBAMIQUE :**

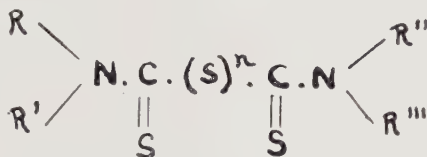
de formule générale :



Ils ont été expérimentés d'abord en Amérique, en 1931, où, depuis, on les emploie surtout contre le Bitter-Rot, la Rouille, la Tavelure et autres maladies des arbres fruitiers. On s'en sert également pour traiter les semences.

— **LES SULFURES DE THIURAME :**

dont la structure est la suivante :



Ils se rapprochent considérablement des Dithiocarbamates, mais ils sont moins efficaces que ces derniers contre le Mildew de la Vigne. Ils sont utilisés depuis longtemps dans l'industrie du caoutchouc, comme « accélérateurs de vulcanisation ».

— **LES COMPOSES QUINONIQUES :**

Les quinones sont des composés cycliques que l'on prépare en remplaçant, dans le noyau benzénique, 2 atomes d'hydrogène par 2 atomes d'oxygène :



Dans ce groupe, on emploie surtout le TETRACHLOROPARA-BENZOQUINONE ou CHLORANIL, utilisé pour la désinfection des semences (cependant il est à peu près inactif contre la Carie du Blé).

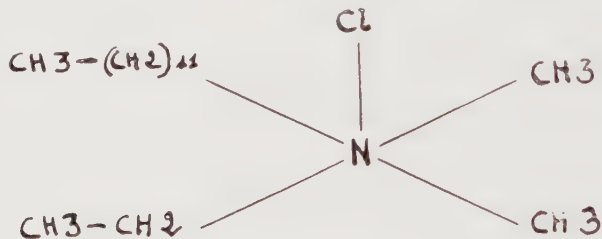
— LES DERIVES D'AMMONIUM QUATERNAIRES :

L'Ammonium est le Radical hypothétique (NH^4) formé d'Azote et d'Hydrogène, se trouvant dans les sels ammoniacaux où il fait fonction de métal alcalin. Les sels d'ammonium sont volatils ou altérables par la chaleur. Ils dégagent du gaz ammoniac en présence d'une base fixe (la potasse par exemple).

Utilisés d'abord comme mouillants, puis comme Bactéricides, les ammoniums quaternaires ont été commercialisés aux Etats-Unis comme anti-cryptogamiques depuis 1944. Ils sont plus ou moins inodores, presque tous solubles dans l'eau et l'alcool. Mais ils sont incompatibles avec les savons (perte d'activité). Ils sont légèrement toxiques pour les Vertébrés.

Leur emploi paraît intéressant sur les Plantes en cours de végétation : contre le Rhizoctone brun de la Pomme de Terre, par exemple, ou la Tavelure du Pommier.

L'un des plus intéressants d'entr'eux est le CHLORURE DE DIMETHYL DILAURYL AMMONIUM, commercialisé sous le nom d'ISOTHAN DL, et dont la formule est :

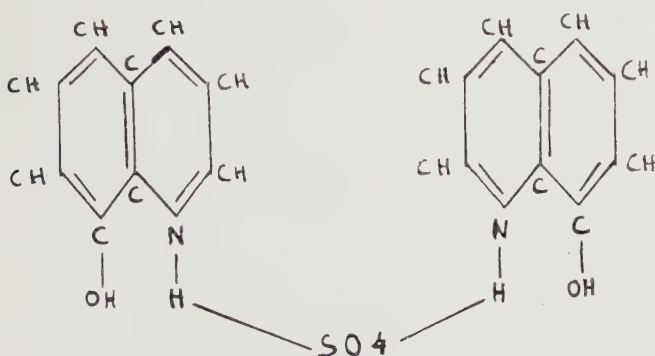


Un autre dérivé d'Ammonium quaternaire intéressant serait le PURATISED 111-5, composé résultant d'une combinaison avec un complexe organo-mercurique, et encore à l'étude à l'heure actuelle. Il se présente sous la forme d'un liquide qui posséderait de très grandes propriétés Fongicides et Fongostatiques

— L'OXYQUINOLEINE ET SES DERIVES :

L'Oxyquinoléine, appelée encore CARBOSTYRILE, a été employée depuis des années comme agent anti-infectieux et anti-bacillaire. Ses propriétés pharmacodynamiques et thérapeutiques sont intéressantes. Elle se présente sous forme d'une poudre cristalline douée également d'excellentes propriétés anticryptogamiques et antiseptiques. Elle agit sur le métabolisme et sur les cellules des assises génératrices telle une hormone végétale, favorisant ainsi le développement de la plante. A doses infinitésimales, elle détruit le cryptogame parasite ou empêche sa croissance. Ce produit est employé également pour la conservation des tabacs à la concentration de 4/10.000, notamment lorsque tabacs ou cigarettes sont destinés aux pays chauds et humides.

On l'utilise généralement sous forme de SULFATE NEUTRE D'ORTHOXYQUINOLEINE, de formule :

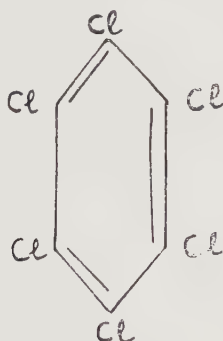


— LE CHROMATE COMPLEXE DE CUIVRE-ZINC (TABLEAU C) :

Le Chromate complexe de Cuivre-Zinc est un anti-cryptogamique puissant, commercialisé aux Etats-Unis sous le nom de CHROMATE 169. Il est dénué de toute action phytocide et s'est montré très actif contre le Mildew et l'Alternariose de la Pomme de Terre. Encore à l'essai à l'heure actuelle, il promet d'être un Fongicide d'avenir.

— LES DERIVES DU BENZENE :

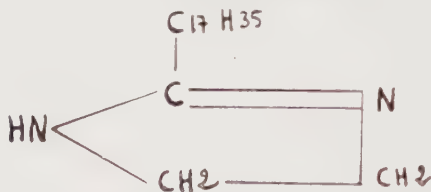
Les vapeurs de Benzène (C_6H_6) furent utilisées pour la première fois, il y a une dizaine d'année, contre le Mildew du Tabac. Depuis, l'un de ses dérivés, l'HEXACHLOROBENZENE :



est très employé en France, surtout contre la Carie du Blé (c'est d'ailleurs le Fongicide spécifique de cette maladie contre laquelle il est très actif). Il présente, de plus, l'avantage d'être facilement maniable, d'effet durable et très peu toxique pour l'homme et les animaux supérieurs.

— LES DERIVES DE LA GLYOXALIDINE :

La 2 HEPTADECYLGLYOXALIDINE, de formule :



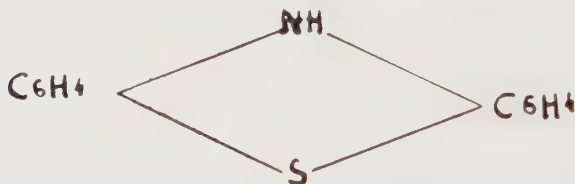
a une bonne valeur Fongicide, mais son activité n'est pas assez durable. On l'emploie cependant contre la Tavelure du Poirier.

— LES DERIVES DE LA DIPHENYLAMINE :

Ils ont des propriétés anticryptogamiques plus ou moins remarquables et sont employés en général contre la Tavelure du Pommier et le Rot Brun des Fruits.

— LA PHENOTHIAZIDE :

De formule :



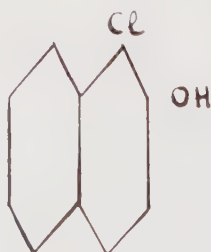
est utilisée en poudrage à sec contre le Mildew de la Pomme de Terre, mais on l'utilise plutôt pour ses propriétés insecticides que pour ses propriétés anti-cryptogamiques.

— LES DERIVES DU FURFUROL :

Le Furfurol est une aldehyde du groupe du FURFURANE, mais il est très toxique ; et si ses composés possèdent des propriétés anticryptogamiques certaines, il importe néanmoins de poursuivre des essais les concernant afin de préciser leur valeur Fongicide pratique.

— LES NAPHTOLS (TABLEAU C) :

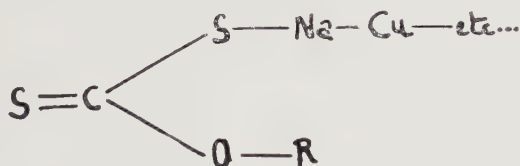
Le plus connu d'entr'eux est l'alpha CHLORO bêta NAPHTOL, expérimenté et mis au point en France, et qui répond à la Formule suivante :



C'est un bon Fongicide, efficace dans les traitements d'hiver des arbres fruitiers : contre la Moniliose, le Coryneum, les Tavelures et la Cloque.

— **LES ALCOYLXANTRATES** (TABLEAU C) :

Les alcoylxanthates, esters de l'acide dithiocarbonique ou de l'acide carboxylique, répondent à la formule suivante :



R représente ici un radical alcoyl.

Ce sont d'assez bons Fongicides, surtout contre le Bitter-Rot et le Rot-Brun.

— **LE DIHYDROXYDICHLORODIPHENYLMETHANE**

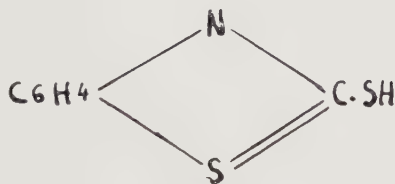
S'emploie pour la protection des textiles contre les moisissures.

— **L'ACIDE BENZOIQUE**

Possède des propriétés Fongostatiques à l'égard des moisissures.

— **LE MERCAPTOBENZOTHAZOLE**

De formule :



est utilisé pour le traitement des graines.

— **LES COMPOSES ORGANO-MERCURIQUES**

Ce groupe est, de loin, le plus important dans la Classification des FONGICIDES.

Les Composés ORGANO-MERCURIQUES, utilisés depuis longtemps comme antiseptiques, ont une action Bactéricide remarquable et des propriétés Fongicides importantes. Jouissant d'une force de pénétration assez grande, ils s'emploient en Agriculture dans la désinfection du sol et le traitement des semences ; moyennant certaines précautions, ils n'altèrent pas la faculté germinative des grains, mais il faut les employer aux concentrations agricoles normales, car à doses très élevées, ils risquent d'endommager les gemmules.

Ils sont d'ailleurs assez toxiques, suffisamment pour être inscrits au TABLEAU A des Substances Vénéneuses, et l'emploi de certains d'entr'eux, notamment les IODO ALKYL MERCURE, est interdit en Agriculture, à cause, justement, de leur trop grande toxicité (11).

Si nous avons gardé ce groupe pour le dernier dans la Classification des FONGICIDES, c'est qu'il nous a paru de loin, le plus important, et ne cesse d'offrir depuis quelques années un intérêt grandissant.

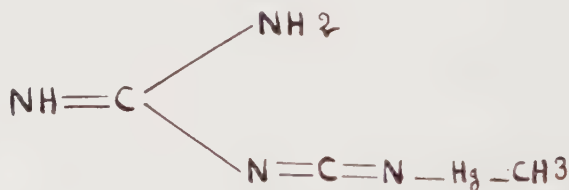
C'est d'ailleurs dans ce Groupe même que nous avons choisi le FONGICIDE d'épreuve sur lequel porteront toutes nos expériences à venir :

le METHYL MERCURE DICYAN DIAMIDE

qui répond à la formule suivante :



ou mieux, en formule développée :



Ce produit a été commercialisé sous le nom de Panogen et, pour la commodité de l'exposé, nous le désignerons sous les initiales de M.M.D.D.

Il fut expérimenté tout d'abord en Suède, puis aux Etats-Unis. Ses vapeurs possèdent des propriétés Fongicides appréciables. Le produit commercial est un liquide assez fortement coloré en rouge, ce qui présente l'avantage de permettre de le déceler facilement, même en solution très diluée, et de suivre son évolution journalière à travers les milieux d'épreuve solides.

D'ailleurs, un autre moyen nous est donné de le déceler facilement, car le M.M.D.D. présente à la Lumière de Wood, une fluorescence rouge-orangé, tout à fait caractéristique.

II. - Méthodes actuelles de caractérisation et de mesure des Fongicides.

De cet exposé sur la Formule Chimique des composés organiques de synthèse à propriétés FONGICIDES, il ressort que leur seul caractère commun, celui qui présente pour l'Agronome un intérêt, c'est leur Pouvoir FONGICIDE.

Caractériser ce pouvoir et doser son activité s'est donc trouvé au premier chef des préoccupations des chimistes des industries de fabrication.

Il nous a donc paru intéressant de faire un rapide tour d'horizon des méthodes utilisées jusqu'à ce jour dans ce domaine. Il semble d'ailleurs que chaque Laboratoire ait ses méthodes de travail.

C'est ainsi qu'à la Section de CRYPTOGRAMIE de la STATION DE BIOLOGIE AGRICOLE DE SURESNES, on opère de la façon suivante (4) :

A. - Choix et obtention des Souches d'expérience. — On s'adresse en général, à des Champignons parasites :

a) TILLETIA TRITICI (Bjerk) (agent de la Carie du Blé), dont on utilise les Chlamydospores obtenues à partir de pustules formées sur une variété sensible de Blé par une race virulente de parasites. Elles en sont extraites par effritement sur tamis à mailles de 1,5 mm, et séparation des débris grossiers par passage à travers une toile métallique plus fine.

b) MONILIA FRUCTIGENA (Pers) (agent du Rot-Brun des fruits), que l'on cultive sur gélose à la farine d'avoine et dont on récolte les spores après 8 jours en boîte de Pétri.

c) ALTERNARIA TENUIS (Nees) (parasite de l'Ivraie), cultivé sur gélose au bouillon de carottes et dont on récolte les spores sur culture de trois jours obtenues par repiquage d'une culture âgée de dix jours.

d) PLASMOPORA VITICOLA (Berk et Curt) (agent du Mildew de la Vigne), cultivé sur feuilles de Vigne maintenues en survie dans une chambre spéciale climatisée, permettant l'entretien de la souche, les repiquages et la récolte continuels.

B. - Techniques des essais d'efficacité antifongique : Elles sont au nombre de trois :

a) TECHNIQUE DE GASSNER : Elle consiste à provoquer la germination de spores ayant conservé leur pouvoir germinatif, après avoir essayé sur elles, dans des conditions aussi voisines que possible de la pratique, le produit à essayer.

Mode opératoire : On opère sur limon de terre humide, on infecte des grains de Blé par agitation avec des spores de *TILLETIA TRITICI* et on traite ensuite ces mêmes grains de Blé avec le produit à étudier. Après les avoir maintenus pendant une semaine à 10°, on

cherche à observer et à dénombrer si possible, les spores de *TILLERIA TRITICI* qui ont résisté au traitement.

Nota. — Cette méthode est intéressante, mais n'apprécie que le pouvoir Fongicide massif.

b) TECHNIQUE INSPIREE DE MAC CALIAN. — Cette technique consiste essentiellement à comparer la germination en chambre humide sur lame de verre traitée, des conidiés mises en suspension dans l'eau pure, d'un champignon d'épreuve.

Mode opératoire : Le champignon d'épreuve adopté est le *MONILIA FRUCTIGENA*. On prépare différentes dilutions « en cascade » du produit à essayer et on le répartit sur des lames. C'est sur ces mêmes lames que l'on dépose ensuite des suspensions de spores de *MONILIA FRUCTIGENA* (dont on a préalablement déterminé la richesse à l'hématimètre). On laisse incuber les lames pendant 24 heures à 20°.

Résultats : Deux cas peuvent se présenter :

— ou bien seules les doses liminaires d'inhibition sont retenues ;

— ou bien on peut compter pour chaque dose les spores germées et non germées, sur un total de 50.

c) TECHNIQUE PAR INCORPORATION AU MILIEU DE CULTURE. — Le Champignon d'épreuve est ici *STERIGMATOCYSTIS NIGRA* (V. Tiegh) (Aspergillacée saprophyte). On opère sur Milieu de *CZAPECK* réparti à la pipette jaugée en volumes égaux, en boîtes de Pétri stériles. Onensemence sur toute la surface ou par points suivant que l'on veut connaître :

— la dose la plus faible inhibant complètement le Champignon ;

— l'action du produit sur la vitesse de croissance du Champignon.

D'autres chercheurs ont utilisé des méthodes analogues, mais en s'adressant à divers Champignons :

— *VENTURIA PIRINA* (Aderh)

ou — *BOTHRYTIS CINEREA* (Pers), par exemple.

Parmi ces diverses techniques, l'une d'elles semble devoir présenter un certain intérêt, c'est celle qui s'adresse au *MYROTHECIUM VERRUCARIA* et qui semble vouloir constituer un essai de normalisation du Test FONGICIDE (13).

En effet, l'étude de la physiologie des spores du *MYROTHECIUM VERRUCARIA* a montré que le gonflement et la germination des spores étaient favorisés par la présence de sucre et d'extrait de levure, mais étaient particulièrement affectés par les FONGICIDES.

On a donc pensé à établir une méthode de détermination de l'activité fongicide basée sur le gonflement des spores. Ce gonflement est facile à mesurer par centrifugation.

De plus, cette méthode avait l'avantage d'être rapide (2 à 3

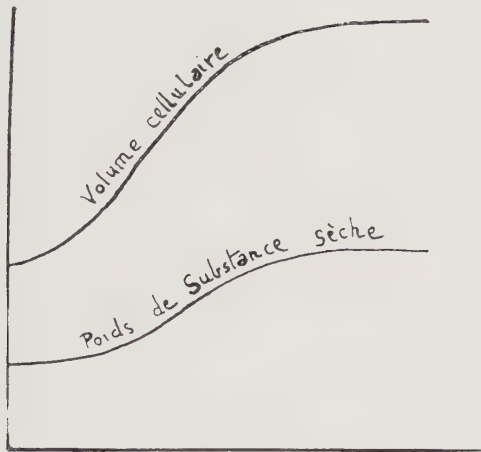
heures), et de ne pas nécessiter de règles d'aseptie très rigoureuses, en raison justement de la rapidité de la manipulation.

Exposé de la Méthode : On opère à partir de spores cultivées sur papier-filtre au-dessus d'agar-agar dans des Erlenmeyers, et on fait une suspension dans l'eau distillée.

15 cc. de cette suspension sont agités avec 20 cc. de Saccharose et d'extrait de Levure, et 15 cc. du FONGICIDE à étudier à la concentration choisie. On met à l'étuve une nuit à 30°, on lave deux fois et on remet en suspension dans la solution de sucre et d'extrait de Levure. Les volumes cellulaires sont déterminés après 3 heures d'incubation, d'après la formule suivante :

$$\frac{\text{Volume final en présence d'un inhibiteur} - \text{Volume initial}}{\text{Volume final sans inhibiteur} - \text{Volume initial}} \times 100$$

Résultats : On constate que, après une heure, le poids de substance desséchée croît d'une manière logarithmique, tandis que le volume cellulaire ne suit pas une évolution aussi bien déterminée. Il n'y a pas accroissement constant, mais graduel.



On constate également quelques changements morphologiques se produisant au cours du gonflement.

Inconvénients de cette Méthode :

- 1° Elle est délicate et peu pratique, quoique rapide ;
- 2° Elle ne permet pas d'être étendue à une généralité car elle s'applique au cas particulier du MYROTHECIUM VERRUCARIA et la plupart des Champignons courants tels que l'ASPERGILLUS NIGER y sont réfractaires ;
- 3° Prendre comme test de vitalité du Champignon le gonflement de ses spores semble un peu prématuré. Car des spores, placées dans certaines conditions, peuvent très bien gonfler, par pur effet mécanique, et cela ne traduit pas forcément leur germination.

Objet de notre Travail

Du rapide tour d'horizon que nous venons de faire des Méthodes employées jusqu'à ce jour et des principaux produits chimiques utilisés comme Fongicides, il ressort la nécessité d'une NORMALISATION DES TESTS FONGICIDES. En effet, une telle multiplicité de Méthodes et de Produits utilisés est extrêmement gênante pour l'expérimentateur : Tant en Agriculture qu'en Toxicologie, un essai de standardisation serait le bienvenu.

A. — EN AGRONOMIE, effectivement, la standardisation, ou mieux, la normalisation des Tests Biologiques apporterait, dans le langage de la Phytopharmacie, une précision des plus souhaitables. Elle permettrait, dans des conditions de travail rigoureusement définies, de donner à l'action des composés chimiques sur les végétaux, un indice qui tendrait vers une valeur absolue. La comparaison des produits pharmaceutiques entr'eux ou la vérification de leur efficacité s'en trouverait grandement simplifiée (3).

Il y a quelques années, normaliser les Tests Biologiques eut semblé une tentative audacieuse et prématurée ; à l'heure actuelle, elle entre tout naturellement dans le cadre de nos préoccupations. A condition toutefois, ainsi que nous le trouvons indiqué sous la plume de M. J. LHOSTE, dans son rapport du III^e Congrès international de Phytopharmacie :

« ...de faire une discrimination dans les Tests Biologiques et de distinguer les Tests de Recherches des Tests de Contrôle. »

Il est bien évident, en effet, que les TESTS DE RECHERCHES qui sont utilisés par leurs auteurs pour mettre en évidence une propriété nouvelle d'un corps donné, ne sauraient être assujettis à des normes rigoureuses qui risqueraient de brider dans son essor l'imagination du Chercheur.

Mais il n'en est pas de même pour les TESTS DE CONTROLE, qui sont des méthodes biologiques de dosage. Ils doivent pouvoir servir à identifier un produit inconnu, à définir la qualité d'un produit connu ou la valeur d'une préparation, sur un végétal donné. Dans ce cas, la normalisation des conditions d'expérience est parfaitement souhaitable.

On devra donc choisir, pour arriver à ce but, un matériel d'expérience de fonctionnement simple, et dont il sera facile de se procurer les différentes pièces. Le Produit Etalon choisi le sera sous une forme bien définie, à un pourcentage donné, et les résultats seront donnés sous une forme claire : tableau ou graphique. De plus, le Biologiste n'étant pas forcément un Mathématicien, il ne sera fait usage des sciences exactes que dans la mesure où elle améliorent nettement la signification des résultats.

D'ailleurs, un Comité pour « l'Etude des Tests Biologiques »

a été créé et, dans ce Comité, existera une section chargée de la mise au point du Test Fongicide.

B. — EN TOXICOLOGIE : Le point de vue du Toxicologue rejoint celui de l'Agronome. En effet, ainsi que nous le disions déjà dans l'introduction, il est nécessaire de posséder une Méthode simple permettant de déceler les Substances Fongicides lorsque, employées au cours de la culture du principe alimentaire brut, elles risquent de se retrouver dans les aliments tels qu'ils arrivent au consommateur.

On rencontre, en effet, de nombreux Produits Chimiques dans les aliments, mais il convient d'y déterminer 2 groupes :

1° **Les produits additifs** que l'on y introduit délibérément dans un but pratique et qui sont essentiellement des substances non toxiques destinées à conserver ou à accentuer certaines propriétés avantageuses des aliments. Ce sont par exemple :

— le Trichlorure d'Azote ou l'Acide Ascorbique, pour donner artificiellement à la farine jeune, les propriétés qu'elle aurait acquises en vieillissant ;

— le Bromate de Potassium ou l'Acide Propionique, pour améliorer le pain en cours de cuisson, etc., etc...

2° **Les Adultérants**, qui comprennent une foule de substances susceptibles de provoquer des empoisonnements, et parmi lesquels se trouvent des produits largement utilisés en Agriculture :

— Insecticides dont on pulvérise les fruits et les légumes ;

— Détergents qui servent à nettoyer les récipients ;

— Graisses et lubrifiants dont on enduit les machines ;

— Fongicides, enfin, dont l'usage agricole est devenu journalier pour les Blés de Semence notamment, afin de préserver la récolte des maladies cryptogamiques.

Il semble, en effet, que les intoxications de Pont-Saint-Esprit n'aient pas eu d'autre origine. On sait que, dans cette affaire, des sacs de farine entreposés ont été imprégnés par un Fongicide. Selon toute vraisemblance, un flacon de ce produit liquide a été cassé par mégarde et son contenu, resté étalé sur le plancher, gagna les sacs de farine qui y furent déposés. On connaît les conséquences de cette insouciance... (19).

Les affaires de ce genre, loin d'être rares, se renouvellent au contraire assez souvent dans l'histoire de la Toxicologie, mais ne sont heureusement pas toujours aussi graves. Cependant, l'analyse chimique étant trop souvent impossible à réaliser, c'est ce qui nous a incité à entreprendre un travail dont le but est la mise au point et la normalisation de Tests Biologiques concernant les Substances FONGICIDES et FONGOSTATIQUES de Synthèse.

CHAPITRE II

MÉTHODES METTANT EN ŒUVRE DES ESPÈCES SAPROPHYTES

Nous grouperons dans ce Chapitre celles de nos expériences qui ont porté sur des Champignons appartenant à des ESPÈCES SAPROPHYTES.

Pour ces observations, nous avons choisi de nous adresser à un éventail de quatre Champignons présentant vis-à-vis des FONGICIDES un degré de résistance différent. Ce sont :

RHIZOPUS NIGRICANS (Ehr) (Mucoracées)

ASPERGILLUS FLAVUS (V. Tiegh) (Aspergillacées)

PENICILLIUM ROQUEFORTI (Thom) (Aspergillacées)

ALTERNARIA SOLANI (E. et M.) (Hyphomycète).

Ces quatre espèces ont toujours été ensemencées à partir de souches identiques, isolées, repiquées et entretenues par nos soins sur MILIEU de RAULIN gélosé, en tubes inclinés.

Et sur ces Champignons ainsi obtenus et conservés à l'état pur, nous avons expérimenté diverses méthodes :

I. — Méthode des dilutions en milieu liquide

II. — Méthode des dilutions en milieu solide

III. — Méthode personnelle inspirée de la technique de Heatley et de Fleming.

Ces expériences nous conduiront à un **dosage** du pouvoir Fongicide et Fongostatique du M.M.D.D. par rapport à chacun des Champignons envisagés et, du point de vue de leur comportement vis-à-vis des Fongicides, à un **classement** de ces Champignons, par l'étude de leurs développements comparés.

I. - Méthode des dilutions en milieu liquide

Cette expérience va nous conduire à examiner **séparément** chacun des Champignons-Tests en question. Car, en milieu liquide, il nous a fallu renoncer à cultiver dans une même Boîte les quatre Champignons à la fois. En effet, les manipulations que nécessite l'expérience impriment au liquide un certain nombre de mouvements qui ont pour résultat de mêler au sein du milieu les diverses coloniesensemencées, de sorte que les résultats obtenus deviennent indéchiffrables. De plus, certains Champignons ayant un mycelium beaucoup plus superficiel que d'autres, ce tapis mycélien, particulièrement abondant en milieu liquide, masque le développement des autres colonies. Tel est justement le cas du RHIZOPUS NIGRICANS.

C'est pourquoi cette Méthode des Dilutions en milieu liquide n'a pu être interprétée qu'à la condition d'étudier **séparément** sur chacun des Champignons, l'action de **doses croissantes** de METHYL MERCURE DICYAN DIAMIDE.

Nous allons donc déterminer pour chaque Champignon et vis-à-vis de ce corps :

- a) la Dose FONGICIDE ;
- b) la Dose FONGOSTATIQUE.

MILIEU DE CULTURE

Nous avons choisi pour cette expérience, comme d'ailleurs pour la plupart de celles qui vont suivre, le MILIEU neutre de RAULIN, dont la Formule est la suivante :

Eau	1.500	Grs
Sucre Candi	70	»
Tartrate Neutre de K	6,50	»
Nitrate d'Ammonium	4,50	»
Phosphate de K	0,60	»
Carbonate de Mg	0,40	»
Sulfate de K	0,25	»
Sulfate de Zinc	0,07	»
Sulfate de Fer	0,07	»
Silicate de K	0,07	»

La neutralité a été vérifiée par mesure du Ph au comparateur de HELIGE ou au PH-mètre de VOIRET.

TECHNIQUE EXPERIMENTALE

Dans une série de x Boîtes de Pétri stériles, nous coulons 19 cm³ de Milieu de Raulin neutre, liquide et stérile. Puis, nous ensemençons généreusement avec une colonie pure de

RHIZOPUS NIGRICANS (Erhenbergii)

A l'aide d'une micro-burette, nous introduisons dans toutes les

Boîtes, sauf 2, diverses quantités de solution aqueuse de M.M.D.D., ce qui a pour résultat d'établir dans chacune d'elles, des concentrations différentes de ce Fongicide.

Les 2 Boîtes ainsi réservées serviront de TEMOINS afin de vérifier si la souche de RHIZOPUS NIGRICANS employée était normale et de pouvoir comparer son comportement par rapport aux colonies formées dans les autres bacs d'analyse, en présence de M.M.D.D.

Le volume total de liquide est alors porté dans chaque Boîte à 20 cc. par addition d'eau distillée, et l'ensemble des Boîtes est maintenu à l'étuve à 27° pendant plusieurs jours.

En fait, nous sommes partis d'une solution mère titrant 10 % de M.M.D.D. et nous avons opéré de la façon suivante :

	Milieu de Raulin	M.M.D.D. au 1/10 ^e	Eau	Concentration obtenue
BOITES T	19 cc.	0	1 cc.	
BOITE 1	19 cc.	1 cc.	0	1/200
BOITE 2	19 cc.	0,50 cc.	0,50 cc.	1/400
BOITE 3	19 cc.	0,25 cc.	0,75 cc.	1/800
BOITE 4	19 cc.	0,20 cc.	0,80 cc.	1/1.000

Bien entendu, les quelques chiffres indiqués dans ce Tableau ne sont là qu'à titre d'exemple, car nous avons fait porter nos expériences sur un grand nombre de Boîtes en variant les concentrations à l'infini, et en rendant les écarts entr'elles de plus en plus minimes.

Nous sommes ainsi parvenus à déterminer avec précision :

1° La concentration pour laquelle le Champignon ne pousse plus (par inhibition de la germination des endospores ensemencées).

C'est la **Dose Fongicide** liminaire.

2° La concentration pour laquelle la spore germe et donne une colonie qui développe son appareil végétatif mycélien, mais ne produit pas de sporangiophores ni de sporanges noirs (noirs dans le cas du RHIZOPUS NIGRICANS) :

C'est la **Dose Fongostatique**.

Le même protocole expérimental a ensuite été fidèlement suivi pour expérimenter chacun des trois autres Champignons que nous nous sommes proposés d'étudier, à savoir :

l'ASPERGILLUS FLAVUS (V. Tiegh)
le PENICILLIUM ROQUEFORTI (Thom)
et l'ALTERNARIA SOLANI (E. et M.).

CONTROLE DE CETTE METHODE

Quoique les résultats obtenus à l'aide de ce protocole (résultats

que nous énonçons ci-après), aient en tous points coïncidé avec ceux que nous avons obtenus au cours d'expériences postérieures (en d'autres termes : aient été constants), nous avons tenu à contrôler cette façon d'opérer par un dernier Test :

Alors que jusqu'à présent, chacune de ces expériences, portant chacune sur un Champignon différent, a été conduite séparément, nous avons désiré que les 4 Champignons-Tests soient expérimentés une dernière fois dans 4 séries **différentes**, mais **simultanées**. Ainsi se sont trouvées réunies exactement les mêmes conditions de température, de pression et d'humidité.

C'est ainsi que nous avons pris 4 séries de n Boîtes de Pétri que nous avons ensemencées chacune avec l'un des Champignons à étudier, selon un procédé identique à celui énoncé plus haut. Toutes les Boîtes ont alors été placées au même endroit, à la même température et laissées en observation pendant un nombre de jours rigoureusement identique.

Les constatations que nous avons pu faire alors coïncidaient parfaitement avec les résultats que nous avions obtenus au cours des expériences individuelles.

LES RESULTATS OBTENUS

— Pour le RHIZOPUS NIGRICANS :

- a) **Dose Fongicide** : 1/1.500
- b) **Dose Fongostatique** : 1/2.000.

— Pour l'ASPERGILLUS FLAVUS :

- a) **Dose Fongicide** : 1/1.000
- b) **Dose Fongostatique** : 1/1.200.

— Pour le PENICILLIUM ROQUEFORTI :

- a) **Dose Fongicide** : 1/200
- b) **Dose Fongostatique** : 1/250.

— Pour l'ALTERNARIA SOLANI :

- a) **Dose Fongicide** : 1/1.700
- b) **Dose Fongostatique** : 1/2.250.

DISCUSSION DES RESULTATS

L'énoncé ci-dessus nous montre que ces divers Champignons ont opposé des résistances très variables à l'action du M.M.D.D. Ils sont donc plus ou moins vulnérables aux agents FONGICIDES et plus ou moins influençables par l'action FONGOSTATIQUE.

Le PENICILLIUM, notamment, s'est nettement détaché comme le plus résistant ; il a même opposé au M.M.D.D. une résistance et une vitalité étonnantes qui le font arriver nettement en tête des autres Champignons. C'est une constatation qu'il nous sera d'ailleurs encore donné de faire, au cours d'expériences ultérieures.

L'ALTERNARIA SOLANI et le RHIZOPUS NIGRICANS, par contre, se sont manifestés comme, de beaucoup, les plus vulnérables.

Quant à l'ASPERGILLUS FLAVUS, il représente une position moyenne.

Ces diverses constatations nous ont permis d'établir un CLASSEMENT de ces Champignons par ordre de résistance croissante aux FONGICIDES. Ce classement est le suivant :

- 1° ALTERNARIA SOLANI ;
- 2° RHIZOPUS NIGRICANS ;
- 3° ASPERGILLUS FLAVUS ;
- 4° PENICILLIUM ROQUEFORTI.

N.B. — Il est intéressant de noter que le Classement que l'on pourrait établir par ordre de résistance croissante à l'action FONGOSTATIQUE respecte le même ordre.

INTERET PRATIQUE DE CETTE METHODE

Nous aurions aimé que les degrés de l'échelle ainsi établie soient équidistants ; notamment, nous aurions désiré trouver des Micro-organismes saprophytes intermédiaires entre l'ASPERGILLUS FLAVUS et le PENICILLIUM ROQUEFORTI, car on perçoit tout l'intérêt de cette Méthode qui, dans son principe, représente une estimation quantitative par voie biologique de l'action Fongicide et Fongostatique.

Malheureusement, les souches auxquelles nous nous sommes adressés ne nous donnent pas entière satisfaction à ce point de vue, mais méritent quand même que l'on s'y arrête car elles constituent une échelle comparative à laquelle on peut s'adresser :

— soit pour y rapporter un autre Champignon dont on veut connaître la résistance aux Fongicides et, dans ce cas, le Fongicide employé doit toujours être le M.M.D.D. ;

— soit pour étudier le pouvoir d'un nouveau Fongicide et, dans ce cas, les Champignons-Tests demeureront inchangés ;

— soit pour estimer approximativement la quantité de M.M. D.D. contenue dans une dilution de ce produit. En effet, pour cela, il suffit de se rapporter au Tableau suivant :

	Pouvoir FONGICIDE	Pouvoir FONGOSTATIQUE
Sur l'ALTERNARIA	1./1.700	1/2.250
Sur le RHIZOPUS	1/1.500	1/2.000
Sur l'ASPERGILLUS	1/1.000	1/1.200
Sur le PENICILLIUM	1/200	1/250

N.B. — Dans tous les cas, bien entendu, l'identité des conditions d'expérience sera respectée.

II. - Méthode des dilutions en milieu solide

Il nous avait paru intéressant de tenter une expérience similaire à la précédente, mais en milieu solide, pensant ainsi que le développement du Champignon y serait localisé et plus visible.

Nous avons donc adopté comme milieu de culture, le MILIEU de RAULIN GELOSE, dont la formule est la même que dans l'expérience précédente, à ceci près qu'il contient 30 0/00 de gélose, ce qui a la propriété de le rendre solide en refroidissant.

TECHNIQUE EXPERIMENTALE

La technique expérimentale ressemble, dans son début, à celle de la Méthode des Dilutions en Milieu Liquide :

x Boîtes de Pétri, stériles, reçoivent chacune 19 cc. de Milieu de Raulin gélosé, stérile aussi, puis, toutes sauf 2 (les Témoins) vont recevoir **des quantités différentes** de solution de M.M.D.D. au 1/10^e, de façon à établir dans chacune d'elles des concentrations différentes dont la juxtaposition formera une échelle de dilutions progressives (1).

Mais, ce qui était facilement réalisable en milieu liquide s'avère beaucoup plus malaisé en milieu solide : en effet, M.M.D.D., sans être thermolabile, est volatil, et l'incorporer à chaud, au bain-marie (ce qui serait, de beaucoup, le procédé le plus pratique) risquerait d'entraîner la perte d'une partie du principe Fongicide et de perturber les résultats.

Voilà pourquoi, il nous a fallu incorporer le M.M.D.D. juste avant le complet refroidissement du milieu, et la difficulté fut alors de l'incorporer uniformément car le Milieu de Raulin se refroidit très rapidement. Nous avons utilisé pour cela un agitateur stérile avec lequel nous avons malaxé le milieu jusqu'à incorporation complète et uniforme (en cela, d'ailleurs, la coloration du M.M.D.D. nous fut un repère précieux).

En dernier lieu, on procède à l'ensemencement, en stries superficielles, du Champignon envisagé ; et l'on porte à l'étuve à 27° pendant trois jours.

Au bout de ce laps de temps, le Champignon doit avoir formé dans chaque Boîte des colonies dont la prolifération est en rapport direct et inversement proportionnel avec la quantité de M.M.D.D. contenue dans le milieu.

Effectivement, c'est dans les Boîtes Témoins que se trouvent les plus belles et les plus abondantes colonies, tandis qu'elles vont en s'affaiblissant à mesure que la concentration en M.M.D.D. augmente dans le milieu et que, pour une concentration donnée (différente pour chaque Champignon envisagé), rien ne pousse plus. La germination des spores et le développement mycelien sont inhibés.

(1) Se reporter au Tableau de la Page 26.

INCONVENIENTS DE CETTE METHODE

Cependant, l'enchaînement des diverses phases de ce développement, tel que nous venons de l'énoncer, est plus théorique que réel car, le mode opératoire de cette Méthode nécessitant de garder la Boîte de Pétri ouverte pendant un temps assez long, il s'ensuit une certaine pollution due aux microorganismes toujours présents dans l'atmosphère du Laboratoire ⁽¹⁾, ce qui provoque le développement de colonies parasites qui gênent ensuite l'observation des souches intéressantes.

Cette observation est confirmée par le fait que, dans les deux Boîtes Témoins qui n'ont pas reçu de M.M.D.D. et ne sont donc pas restées ouvertes longtemps, les colonies sont demeurées très pures.

RESULTATS OBTENUS

On voit donc que les résultats obtenus sont assez imprécis, et c'est pourquoi nous ne les énoncerons pas dans le détail. Cependant, renouvelée plusieurs fois et à des concentrations différentes, cette Méthode nous a permis de contrôler, dans leur ensemble, les résultats obtenus au cours de l'expérience précédente.

Il ne faut donc pas la considérer comme indépendante et décisive en soi, mais comme un contrôle de la Méthode des Dilutions en Milieu Liquide. Ne serait-ce qu'à ce point de vue, elle nous a paru présenter un certain intérêt ⁽²⁾.

(¹) Nous n'avons pas de hotte àensemencement.

(²) L'utilisation d'un milieu gélatiné et l'usage de la hotte àensemencement semblent, en effet, donner de meilleurs résultats.

III. - Méthode personnelle

Inspirée des Techniques de Heatley et de Fleming

Nous nous sommes inspirés pour cette troisième expérience de deux Méthodes mémorables mises au point en 1928, par FLEMING et HEATLEY, au temps des débuts de la PENICILLINE dans la thérapeutique moderne.

Qu'il nous soit permis de rappeler brièvement ici ces Méthodes auxquelles nous faisons allusion :

1° EXPERIENCE DE FLEMING (2)

C'est en reprenant après quelques jours une Boîte de Pétri sur laquelle il travaillait, que FLEMING s'aperçut que la colonie de Staphylocoques qu'elle contenait était polluée par une moisissure verte.

Le fait, en lui-même, était banal, et pour beaucoup serait demeuré sans importance, mais FLEMING l'examina attentivement et constata avec surprise que les colonies de Staphylocoques proches de la moisissure étaient plus petites que les autres et commençaient à dégénérer. Il en conclut que cette moisissure (qui fut plus tard identifiée comme étant un *PENICILLIUM NOTATUM* WESTLING, de la série *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* THOM) devait sécréter une substance anti-bactérienne qui affectait le Staphylocoque. La PENICILLINE était née.

C'est alors que FLEMING, désireux de connaître les autres germes sensibles à l'action de la PENICILLINE, imagina un procédé ingénieux : ayant constaté que la Pénicilline diffusait bien dans l'agar-agar, il creusa dans une plaque de culture, un canal qu'il remplit d'agar-agar imprégné de Pénicilline, puis il ensemença en stries disposées à angle droit par rapport au canal, divers germes dont il voulait connaître la sensibilité à la Pénicilline.

C'est ainsi que furent expérimentés simultanément :

- 1e COLIBACILLE
- 1e STAPHYLOCOQUE
- 1e STREPTOCOQUE HEMOLYTIQUE
- 1e PNEUMOCOQUE
- 1e GONOCOQUE
- 1e BACILLE DIPHTERIQUE
- 1e BACILLUS INFLUENZAE.

La résistance de chacun des germes et, par conséquent, l'activité antibiotique de la Pénicilline étaient mises en évidence par la longueur de la colonie développée.

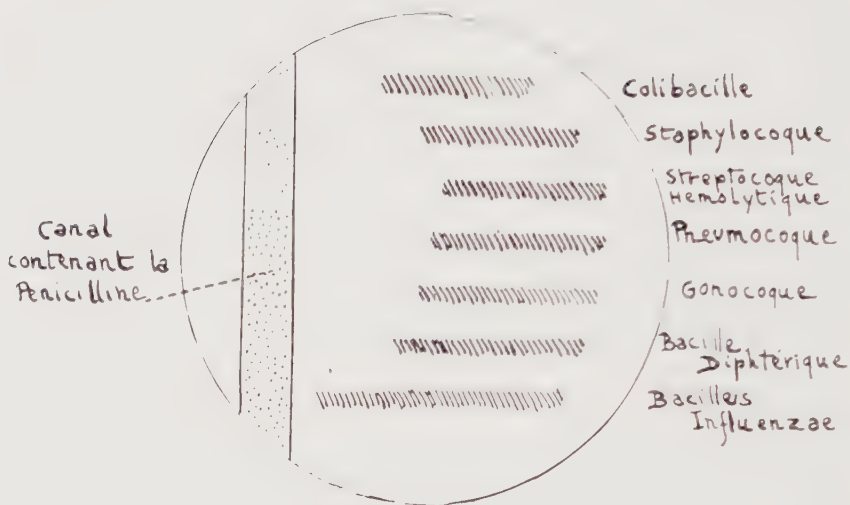


Schéma de l'Expérience

On voit, en effet, que les germes insensibles :
COLIBACILLE
et BACILLUS INFLUENZAE
croissent dans le voisinage immédiat de la Pénicilline, tandis que les autres :

STAPHYLOCOQUE
STREPTOCOQUE HEMOLYTIQUE
PNEUMOCOQUE
GONOCOQUE
et BACILLE DIPHTERIQUE,
sensibles à la Pénicilline, ne se développent qu'à une certaine distance de cette dernière.

2° EXPERIENCE DE HEATLEY

HEATLEY mit au point sa Méthode dite des « petits cylindres » lorsqu'il s'est agi de mesurer l'activité antibiotique de la Pénicilline. En effet, il était intéressant de pouvoir suivre les modifications d'activité de son liquide métabolique afin de pouvoir l'extraire, par aspiration, au moment où il atteindrait son maximum de pouvoir Bactériostatique.

C'est alors que HEATLEY mit au point sa Méthode dont le principe, brièvement exposé, est le suivant :

Des plaques d'agar-agar sontensemencées avec une culture liquide d'un organisme sensible, l'excès de liquide est alors éliminé et la surface de la plaque est desséchée dans une étuve à 37° pendant 2 heures. On pose alors à la surface de l'agar-agar, délicatement et sans presser, quelques petits tubes de verre ou de porcelaine vitrifiée dont le bord inférieur est plan et qu'on flambe au moment de les appliquer hermétiquement sur l'agar-agar.

Les plaques sont alors mises à l'étuve à 37°, la souche ensemencée se développe et l'on observe autour des cylindres une zone

concentrique où la croissance bactérienne est inhibée, c'est ce qu'on appelle le « **halo de bactériostase** ». Le diamètre de cette zone est en relation avec la teneur en Pénicilline du liquide examiné.

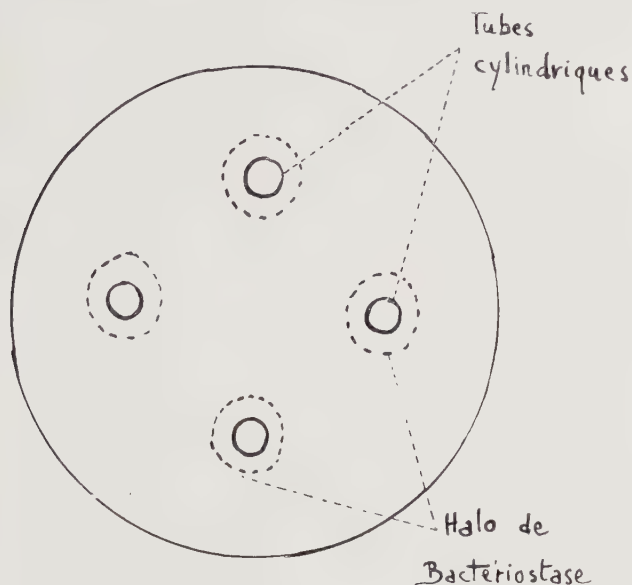


Schéma de l'Expérience

Cette Méthode, qui est encore en honneur dans de nombreux Laboratoires, jointe à l'expérience de FLEMING que nous avons exposée plus haut, nous a inspiré une technique dont le double but est la mise en évidence et le Dosage des Activités FONGICIDE et FONGOSTATIQUE.

EXPOSE DE NOTRE METHODE

Le procédé de HEATLEY, utilisant des tubes cylindriques en verre, contenant la solution à étudier, joint à l'idée de FLEMING d'expérimenter plusieurs souches à la fois par action simultanée d'un liquide diffusant en milieu solide, nous a paru particulièrement intéressant. C'est pourquoi nous avons mis au point une Méthode dont le principe est le suivant :

Des Boîtes de Pétri stériles, et contenant du Milieu de Raulin Gélosé, reçoivent chacune en leur centre un tube de verre cylindrique, ou « Tube de Heatley ». On verse alors à l'intérieur de ce tube une quantité connue de solution de M.M.D.D. titrée avec précision. Puis, à partir de souches pures et entretenues avec soin, on ensemence, aux quatre pôles de la Boîte, les quatre Champignons-Tests choisis pour nos expériences, à savoir :

- le RHIZOPUS NIGRICANS (Erh.)
- l'ASPERGILLUS FLAVUS (V. Tiegh)
- le PENICILLIUM ROQUEFORTI (Thom)
- et l'ALTERNARIA SOLANI (E. et M.).

La solution de M.M.D.D. placée au centre de la Boîte dans le tube de Heatley, va diffuser régulièrement en une zone concentrique qui ira grandissant jour après jour. Son action sur les quatre souches envisagées sera rigoureusement identique :

- mêmes conditions de température
- mêmes conditions d'humidité
- même durée d'expérience.

Les impondérables susceptibles de varier d'une expérience à une autre, même identique en tous points, sont ici réduits au minimum.

Nous pourrions donc comparer avec toute la précision souhaitable, le comportement et le développement simultanés des quatre Champignons.

REMARQUE

Nous nous sommes inspirés, nous l'avons dit, pour établir cette Méthode, de la Technique de HEATLEY. Qu'il nous soit permis cependant de signaler ici des différences notables qui existent entre ces deux expériences :

— alors que dans la Technique de Heatley, la solution Bactéricide agissait sur un milieu uniformémentensemencé, notre Méthode agit **simultanément** sur les quatre souches envisagées ;

— par contre, la Technique de Heatley expérimente plusieurs dilutions de Pénicilline à la fois, tandis que notre Méthode envisagera **chaque dilution** de M.M.D.D. dans une expérience séparée ;

— de plus, Heatley procédait à l'ensemencement du milieu par une culture liquide de Bactérie et éliminait l'excédent de liquide par dessiccation à l'étuve. Dans notre Méthode, l'ensemencement se fait en **stries superficielles**, à partir des souches elles-mêmes.

TECHNIQUE EXPERIMENTALE

On opère dans des Boîtes de Pétri en pyrex de 10 cm. de diamètre, stérilisées à l'autoclave pendant 1 heure à 120°

Chacune d'elles reçoit 20 cm³ de Milieu de Raulin neutre gélifié à 30 0/00 et stérile, puis, lorsque le milieu s'est pris en masse par refroidissement (ce qui est d'ailleurs relativement rapide), l'opérateur place au centre de chaque Boîte, un petit tube de Heatley.

Ces cylindres, dont les dimensions approximatives sont de 8 à 10 mm. de hauteur pour 7 mm. de diamètre extérieur et 5 mm. de diamètre intérieur, doivent être de même grandeur. On les stérilise à sec sur une plaque de Pétri et leur bord inférieur, destiné à s'appliquer sur le milieu, doit être lisse et plan. On les saisit avec des pinces flambées et on les flambe eux-mêmes délicatement avant de les placer. Il ne faut d'ailleurs pas les enfoncer trop profondément, de façon à permettre la diffusion dans le milieu de la liqueur Fongicide.

Puis, à l'aide d'une pipette jaugée et stérile, on introduit dans le cylindre central, 1 cm³ de la solution de M.M.D.D. à étudier. Toutes les Boîtes de chaque série reçoivent un volume égal de solution de M.M.D.D. Seul, le titre de ces solutions change. Deux Boîtes, dans

chaque expérience, sont réservées comme Témoins et reçoivent donc 1 cm³ d'eau distillée.

On ensemence ensuite le milieu aux quatre pôles de la Boîte de Pétri, avec les quatre souches de Champignons en question.

Au bout de quelques jours, le liquide a diffusé à travers la gélose et on observe le comportement des diverses souches ensemencées.

Une amélioration de la Méthode semble être de n'ensemencer qu'après 4 jours de diffusion.

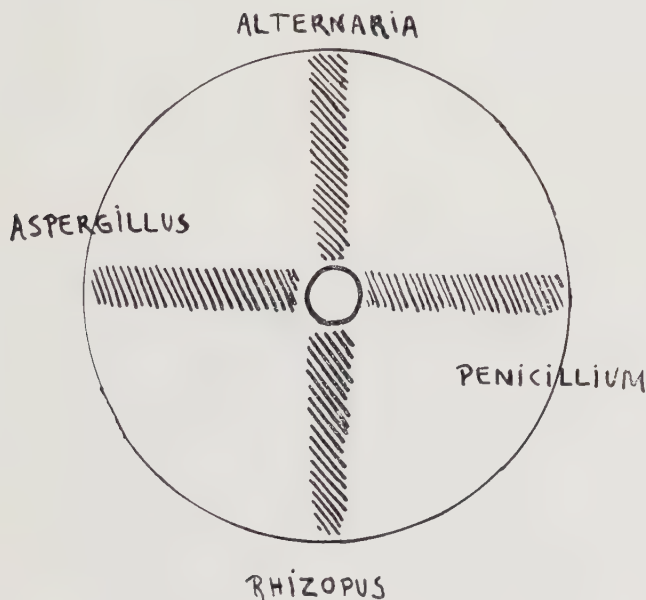


Schéma de la Boîte de Pétri ensemencée
(Orientation et position des Souches ensemencées)

Les expériences sont faites successivement avec :

- du M.M.D.D. concentré
- une solution aqueuse au 1/10^e
- une solution aqueuse au 1/100^e.

Les Boîtes de Pétri sont alors placées à l'étuve et maintenues à 22° pendant toute la durée des observations. Leur évolution est suivie journellement et les résultats que nous énonçons ci-après sont ceux que nous avons obtenus au bout de 10 jours d'expérience, ce laps de temps nous ayant paru suffisant pour permettre la complète diffusion de la solution de M.M.D.D. dans le milieu.

LES RESULTATS OBTENUS

En étudiant le comportement de chaque Champignon séparément, nous constatons que :

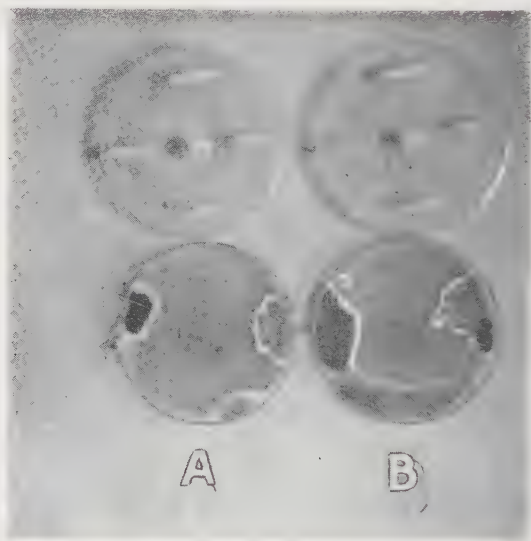
— l'ALTERNARIA SOLANI (E. et M.) ne s'est développé dans aucune Boîte ;

— le *PENICILLIUM ROQUEFORTI* (Thom) s'est développé dans toutes ;

— quant aux *RHIZOPUS NIGRICANS* (Erh.) et à l'*ASPERGILLUS FLAVUS* (V. Tiegh), ils ont donné des colonies plus ou moins importantes suivant la concentration envisagée.

A titre d'exemple, nous donnons ici la photographie de deux Boîtes de Pétri, prise en cours d'expérience : les quatre souches ont étéensemencées ainsi que l'indique le schéma de la page 35, et pour éviter toute confusion, leurs noms respectifs sont indiqués sur les couvercles (ici, enlevés pour la photographie) ; de même, la concentration de la solution de M.M.D.D. expérimentée est indiquée sur l'étiquette centrale.

On remarquera que, si le tube de Heatley placé au centre de la Boîte de Pétri n'est pas visible sur la photographie, le « **halo de Bactériostase** » (ou « halo de Fongostase »), par contre, se distingue très nettement.



— la **Boîte A** a reçu, dans le tube de Heatley placé au centre, 1 cm³ de solution aqueuse de M.M.D.D. au 1/10^e.

— la **Boîte B** a reçu 1 cm³ de solution aqueuse de M.M.D.D. au 1/100^e.

Et nous constatons en effet que l'*ALTERNARIA SOLANI* n'a poussé dans aucune des 2 Boîtes ⁽¹⁾, que le *PENICILLIUM* est présent dans les deux, et que le *RHIZOPUS* et l'*ASPERGILLUS* ont donné chacun une colonie dont la plus importante est nettement celle de la Boîte B qui contient la dilution de M.M.D.D. la plus faible.

⁽¹⁾ La vitalité de la souche ne saurait être mise en doute, l'*ALTERNARIA SOLANI* s'étant très bien développé dans les deux Boîtes Témoins ensemencées à partir de cette même souche.

Cette différence est surtout très sensible dans le cas du RHIZOPUS, qui n'a donné dans la Boîte A qu'une colonie assez réduite, tandis qu'il s'est développé dans la Boîte B au point de former un véritable « mur » surplombant. Ceci est d'ailleurs tout à fait caractéristique du RHIZOPUS qui a une végétation particulièrement « plafonnante ».

INTERPRETATION DES RESULTATS

L'ALTERNARIA SOLANI, disons-nous, n'a poussé dans aucune des Boîtes, nous pourrions donc en conclure que la concentration du milieu atteint et même dépasse le chiffre de 1/1.700 que nous avons établi dans l'expérience des Dilutions en Milieu Liquide, comme étant inhibiteur de cette espèce.

De même, le PENICILLIUM s'étant bien développé dans toutes les Boîtes, il serait logique d'en induire que la concentration du milieu n'a donc pas atteint 1/200, qui est la dose Fongicide pour ce Champignon.

Cependant, certaines observations nous empêchent d'aller aussi loin dans nos conclusions. En effet :

— tout le liquide introduit dans le tube de Heatley ne pénètre pas dans le milieu ; il arrive un moment où cette pénétration est stoppée, même si le tube contient encore quelques dixièmes de cm³ de solution.

Il s'ensuit donc que :

- la zone proche du tube est plus concentrée ;
- la zone périphérique est plus diluée.

C'est pourquoi il est assez prétentieux de vouloir présumer de la concentration du milieu en un point donné de la Boîte de Pétri ; et essayer de calculer cette concentration, s'avère comme très difficile.

Cependant, cette Méthode nous a permis de constater à nouveau que :

— l'ALTERNARIA SOLANI est un Champignon très vulnérable, plus encore que le RHIZOPUS NIGRICANS ;

— l'ASPERGILLUS FLAVUS est un Champignon de résistance moyenne ;

— Quant au PENICILLIUM, il s'avère toujours comme particulièrement résistant.

Classification qui, on le voit, correspond en tous points avec celle que nous avons établie au cours de notre première expérience.

Une observation, d'ailleurs, va nous permettre de confirmer l'extrême vitalité du PENICILLIUM :

OBSERVATION

En reprenant le 9 Janvier, soit 54 jours plus tard, une Boîte de Pétriensemencée le 16 Novembre d'après la Méthode exposée ci-dessus, et ayant reçu dans le tube de Heatley central du M.M.D.D. concentré, nous constatons que, non seulement la Boîte n'a été l'objet d'aucune pollution, mais encore que le PENICILLIUM et, à un degré moindre, l'ASPERGILLUS, ont continué leur progression vers

le centre de la Boîte, nous faisant ainsi assister à un étalement complet et fort intéressant de leur appareil conidien.

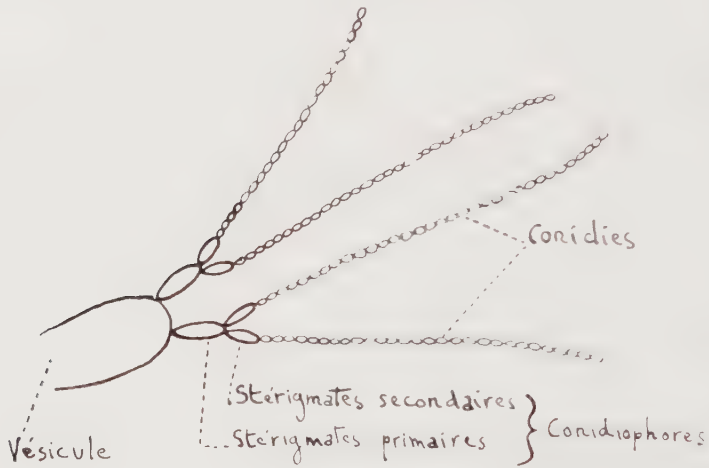
La colonie de *PENICILLIUM*, en effet, observée au microscope, présente très nettement quatre zones ⁽¹⁾ :

— ZONE I : l'appareil conidien est complet : on peut distinguer les conidiophores et les conidies à long pinceau ;

— ZONE II : conidiophores et conidies sont toujours très nets, mais ces dernières présentent un pinceau de plus en plus court ;

— ZONE III : conidiophores seulement, il n'y a plus de conidies ;

— ZONE IV : seul le mycelium subsiste.



ZONE I



ZONE II



ZONE III

⁽¹⁾ Cette Méthode d'investigation microscopique a déjà été utilisée par A. VIGNA pour la partie de sa Thèse de Doctorat en Pharmacie qui fut effectuée au Laboratoire de Cryptogamie de notre Faculté, sous la direction de Monsieur le Professeur PELLISSIER. (20).

Cet étalement spectaculaire semble avoir pour cause deux raisons :

1° - L'épuisement du milieu qui, n'ayant pas été renouvelé, fournissait de moins en moins au *PENICILLIUM* à mesure que le temps s'écoulait, les éléments nécessaires à l'élaboration de son appareil conidien au complet ;

2° - Le fait que le *PENICILLIUM*, progressant vers le centre, abordait ainsi un milieu de plus en plus concentré en M.M.D.D.

L'observation microscopique de la colonie d'*ASPERGILLUS* nous a permis de faire des constatations semblables, mais avec, cependant, beaucoup moins de netteté.

Quant aux autres colonies, elles étaient inexistantes.

Signalons encore que, cette même Boîte reprise le 12 Février, soit le 88^e jour d'expérience, une nouvelle observation nous permet de constater que la colonie de *PENICILLIUM*, ayant continué sa progression lente, a maintenant envahi la totalité de la Boîte de Pétri. Son appareil végétatif, observé au microscope, donne maintenant des signes d'épuisement très nets, mais il n'en demeure pas moins que cette série d'observations nous a apporté la preuve de l'extraordinaire vitalité du *PENICILLIUM*. Vitalité qui le fait se détacher bien en tête de la Classification par ordre de résistance aux agents FONGICIDES et FONGOSTATIQUES.

UNITE FONGICIDE ET DOSAGE

Ces quelques observations, intéressantes certes, ne constituent cependant pas le seul intérêt de cette Méthode. Celle-ci va nous permettre également d'établir une mesure-type de **Pouvoir Fongicide**, calculée pour des conditions d'expériences très précises, de façon à ce que, dans tous les cas, elles soient toujours identiques. Nous l'appellerons :

l'Unité Fongicide

Ce sera :

« La quantité, exprimée en grammes, de la **Substance Fongicide** qui, placée dans un tube de Heatley à raison de 1 cc. de la solution aqueuse, au centre d'une Boîte de Pétri contenant du MILIEU de RAULIN gélosé à 30 0/00 etensemencée à ses quatre pôles par de l'*ASPERGILLUS FLAVUS* (V. Tiegh), produit autour de lui, en 8 jours, un cercle d'inhibition de 4 cms de diamètre. Ceci à la température de 25° centigrades. »

Nous nous sommes servis, pour établir cette définition, de l'activité du M.M.D.D. qui correspond exactement aux conditions requises ci-dessus. C'est-à-dire que 1 cc. de la solution aqueuse au 1/10^e de M.M.D.D. : ce qui correspond exactement à

0,102 gr. de M.M.D.D. commercial

(que nous avons toujours désigné ici sous le nom de Sol. concentrée)

placé, comme nous l'indiquons dans la Définition, dans un tube de Heatley au centre d'une Boîte de Pétri contenant du Milieu de Raulin gélosé à 30 0/00 etensemencée à ses quatre pôles par de l'As-

pergillus, produit, autour de lui, en 8 jours, un cercle d'inhibition de 4 cms de diamètre.

0,102 gr. de M.M.D.D. commercial correspond donc à

1 Unité Fongicide (').

On voit donc aisément quel parti on peut tirer de cette expérience pour le DOSAGE de n'importe quel FONGICIDE. Il suffit de le placer dans des conditions d'expérience rigoureusement identiques à celles requises par la Définition :

- Solution aqueuse de titre connu
- milieu de culture identique
- champignon-test identique
- durée de l'expérience identique
- halo de fongostase (4 cms) identique
- température identique.

Seule variera la **concentration** du FONGICIDE à étudier.

Ncta. — Le halo de Fongostase n'étant pas rigoureusement proportionnel, nous n'avons pas pu nous en servir comme variable. En effet, un cercle d'inhibition de 2 cm. de diamètre n'est pas deux fois inférieur à un cercle d'inhibition de 4 cm. de diamètre, le liquide progressant en zones concentriques qui vont en s'agrandissant au fur et à mesure que l'on s'éloigne du centre.

Si nous avons choisi, pour Champignon-Test de l'expérience, l'ASPERGILLUS FLAVUS (V. Tiegh), c'est parce que c'est un Champignon courant, se développant bien sur milieux de culture usuels et présentant une résistance moyenne aux FONGICIDES.

— l'ALTERNARIA, en effet, était trop peu résistant pour être choisi ;

— le PENICILLIUM, par contre, l'était beaucoup trop ;

— quant au RHIZOPUS qui, théoriquement, eut peut-être représenté l'idéal, nous l'avons écarté aussi à cause de ce feutrage en surplomb que donne son appareil végétatif et qui, adhérant aux couvercles des Boîtes, est extrêmement gênant pour l'observation.

UNITE FONGOSTATIQUE ET DOSAGE

On peut, de la même façon, mesurer l'**activité Fongostatique** d'un Composé, en déterminant d'une façon précise les conditions d'expériences.

(') Devant l'impossibilité à laquelle nous nous sommes toujours heurtés, de connaître la teneur exacte du produit commercial en principe actif fongicide (M.M.D.D.), nous avons pris la décision de rapporter tous nos résultats au Produit Commercial.

La définition de

l'Unité Fongostatique

sera donc :

« La quantité, en grammes, d'un principe (ou de sa solution commerciale) qui, placée dans un tube de Heatley, à raison de 1 cc. de la solution aqueuse, au centre d'une Boîte de Pétri contenant du MILIEU de RAULIN gélosé à 30 0/00 etensemencée à ses quatre pôles par de l'ASPERGILLUS FLAVUS (V. Tiegh), arrête, en 8 jours, la formation des spores ou conidies qui assurent la reproduction de l'espèce. Ceci à la température de 25° centigrades. »

Il faut noter cependant que les critères de détermination de **l'activité Fongostatique** étant moins nettement définis et, surtout, moins facilement visibles que dans le cas de **l'activité Fongicide**, il s'en suit que ce dernier dosage sera moins précis que le premier.

Il convenait cependant de signaler qu'il est possible à réaliser.

CHAPITRE III

MÉTHODES METTANT EN ŒUVRE UN CHAMPIGNON ANAEROBIE

Ce dernier chapitre est consacré aux techniques mettant en œuvre un CHAMPIGNON ANAEROBIE, c'est-à-dire une FORME LEVURE.

Nous nous sommes adressés successivement à la LEVURE DE BIÈRE :

SACCHAROMYCES CEREVISIAE

dont les souches sélectionnées en provenance de l'Ecole de Brasserie de Nancy, nous ont été aimablement fournies par la Brasserie PHENIX.

Puis, à la LEVURE DE BOULANGERIE :

SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS

Ces deux souches étant entretenues et conservées avec soin dans nos Laboratoires à la température optimum de 8°.

A l'aide de ces deux LEVURES, nous avons expérimenté deux Méthodes différentes :

I. — Méthode des Dilutions en tubes (milieu liquide) ;

II. — Méthode originale inspirée de la Technique de Heatley.

Cette dernière Méthode permettra d'établir un graphique mettant en évidence les différences d'action des diverses concentrations de M.M.D.D. en milieu anaérobie.

I. - Méthode des dilutions en tubes (milieu liquide)

La FORME LEVURE étant une forme ANAEROBIE, nous a paru intéressante à étudier, sa présence et son développement se traduisant par une opacité du milieu et un dégagement de bulles de gaz carbonique, faciles à déceler.

Nous l'avons tout d'abord expérimentée en milieu liquide et nous avons fait porter notre choix sur la LEVURE DE BIÈRE ou SACCHAROMYCES CEREVISIAE (souche basse des Brasseries), que nous avons ensemencée dans son milieu de prédilection : le MOUT de BIÈRE.

TECHNIQUE EXPERIMENTALE

L'expérience se fait dans des tubes stériles de 19 cm. de long sur 2 cm. de diamètre, dans lesquels on verse :

— 20 cm³ de Mout de Bière

et — 1 cm³ de M.M.D.D. concentré pour une 1^{re} Série de tubes
— » » au 1/10^e » 2^e »
— » » au 1/100^e » 3^e »

On ensemence ensuite grâce à une suspension de cellules de SACCHAROMYCES CEREVISIAE, fraîchement préparée et appliquée en quantité rigoureusement identique (5 gouttes) pour tous les tubes : Témoins et d'analyse.

On homogénéise aussi uniformément que possible en opérant par battage prolongé avec un agitateur stérile.

Les tubes ainsi ensemencés sont conservés pendant 4 à 5 jours à la température optima de 8°, température à laquelle la Levure de Bière est à son maximum d'activité.

La conduite de l'expérience consiste à noter, à intervalles réguliers, au fur et à mesure de la prolifération du SACCHAROMYCES CEREVISIAE :

— **l'intensité de la fermentation** qui se traduit par un dégagement de CO² décelable par une cloche à gaz placée dans le tube ;

— **la multiplication des cellules Levures** qui se traduit par une plus grande opacité du milieu, appréciable par Néphélémétrie.

Opacité et dégagement de CO² qui, dans un milieu parfaitement homogène, devraient être inversement proportionnels aux différentes concentrations de M.M.D.D. introduites dans chaque tube.

Mais, justement en raison de la difficulté d'incorporation de la Levure dans le milieu, l'homogénéité parfaite n'est jamais réalisée, et la mesure néphélémétrique s'en trouve affectée.

CONCLUSION

Cette Méthode ne permet pas, dans la pratique, la mise au point d'un DOSAGE précis en raison de la difficulté du mode opératoire et du Test de Dosage qui, justement, nécessite une grande homogénéité de milieu et un équipement de Laboratoire que nous n'avons pas à notre disposition (appareil de Warburg).

Cependant, cette technique peut être intéressante et permet d'arriver à des résultats utiles du point de vue qualificatif : elle permet la MISE EN EVIDENCE du Pouvoir FONGICIDE.

II. - Méthode inspirée de la Technique de Heatley (milieu solide)

Bien que la Méthode en milieu liquide n'ait pas été concluante, du point de vue quantitatif surtout, il nous a paru intéressant de ne pas borner là nos recherches sur la FORME LEVURE, et nous avons décidé de l'expérimenter en milieu solide, d'après une Méthode apparentée à la Technique de HEATLEY que nous avons déjà eu l'occasion d'exposer plus haut.

Le milieu solide, en effet, permettra de mieux déceler la présence de la FORME LEVURE, car nous choisirons comme Test de sa présence, non plus l'opacité croissante du milieu qui traduit sa multiplication asexuée, mais le dégagement de CO_2 qui se traduit par la présence de bulles d'air qui sont particulièrement repérables en milieu solide : la gélose se craquèle.

CHOIX DE LA LEVURE-TEST ET DU MILIEU DE CULTURE

Notre choix s'est porté tout d'abord sur la

LEVURE DE BIERE

ou SACCHAROMYCES CEREVISIAE (Hans)

que nous avons expérimentée sur différents milieux de culture :

— sur MILIEU de RAULIN gélosé à 30 0/00, mais les résultats ont été si décevants que nous avons dû l'abandonner ;

— sur MOUT DE BIERE gélosé et neutralisé, le Moût de Bière étant, en principe, le milieu de prédilection du SACCHAROMYCES CEREVISIAE. Mais la gélose ayant un point de fusion assez élevé (58°), la LEVURE de BIERE incorporée à cette température était tuée car ses conditions de vie se trouvent situées entre 0° et 20° , sa température optima étant 8° .

Essai fut donc fait de remplacer la GELOSE par la GELATINE, dont le point de fusion est beaucoup plus bas (22°) :

— sur MILIEU GELATINE-MOUT DE BIERE : le Moût de Bière devant au préalable être ramené à la neutralité ($\text{Ph}=7$) par addition d'une solution d'Ammoniaque. Cette précaution, déjà utile dans le cas du Milieu précédent (Moût de Bière Gélosé), devient ici indispensable. Ainsi préparé, ce dernier Milieu donna de meilleurs résultats que ses prédécesseurs, mais ils furent encore jugés insuffi-

sants car les bulles de gaz carbonique, points de repère traduisant la vitalité de la Levure, n'étaient pas encore assez visibles.

C'est alors que nous avons orienté nos recherches vers une autre FORME LEVURE. Nous nous sommes adressés à

la LEVURE DE BOULANGERIE

ou SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS (Hans)

qui, sur MILIEU de RAULIN NEUTRE Gélosé à 30 0/00, a donné de bons résultats.

TECHNIQUE EXPERIMENTALE

Nous établissons 3 séries de x Boîtes de Pétri stériles dans lesquelles nous coulons 20 cm³ de MILIEU de RAULIN Gélosé à 30 0/00, stérile aussi. Puis, à l'aide d'un agitateur stérile, on ensemente d'une façon aussi homogène que possible le SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS. On opère très rapidement, en entr'ouvrant à peine les Boîtes de Pétri de façon à les protéger de la pollution due à l'atmosphère du Laboratoire.

Au centre se place le Tube de Heatley qui va recevoir :

1 cm³ de M.M.D.D. concentré pour la 1^{re} Série de Boîtes

1 cm³ » au 1/10^e » 2^e »

1 cm³ » au 1/100^e » 3^e »

Les Boîtes de Pétri sont placées et maintenues pendant toute la durée de l'expérience à la température optima de 8°. La solution de M.M.D.D. va ainsi diffuser avec le temps, déterminant autour du Tube de HEATLEY central un « halo de fongostase » de plus en plus grand.

Les progrès de cette diffusion sont suivis journellement, mais cette progression étant assez lente, nous ne donnerons ici que les résultats des observations effectuées de semaine en semaine, qui sont ainsi suffisamment différenciés pour présenter un intérêt et permettre la construction d'un graphique.

LES RESULTATS OBTENUS

Le diamètre du cercle d'inhibition constaté dans chaque Boîte au bout de 8 JOURS est de :

2 cm. pour la Sol. de M.M.D.D. au 1/100^e

2 cm., 7 pour la Sol. de M.M.D.D. au 1/10^e

3 cm., 3 pour le M.M.D.D. concentré (Sol. commerciale)

Au bout de 15 JOURS, les nouveaux diamètres enregistrés sont de :

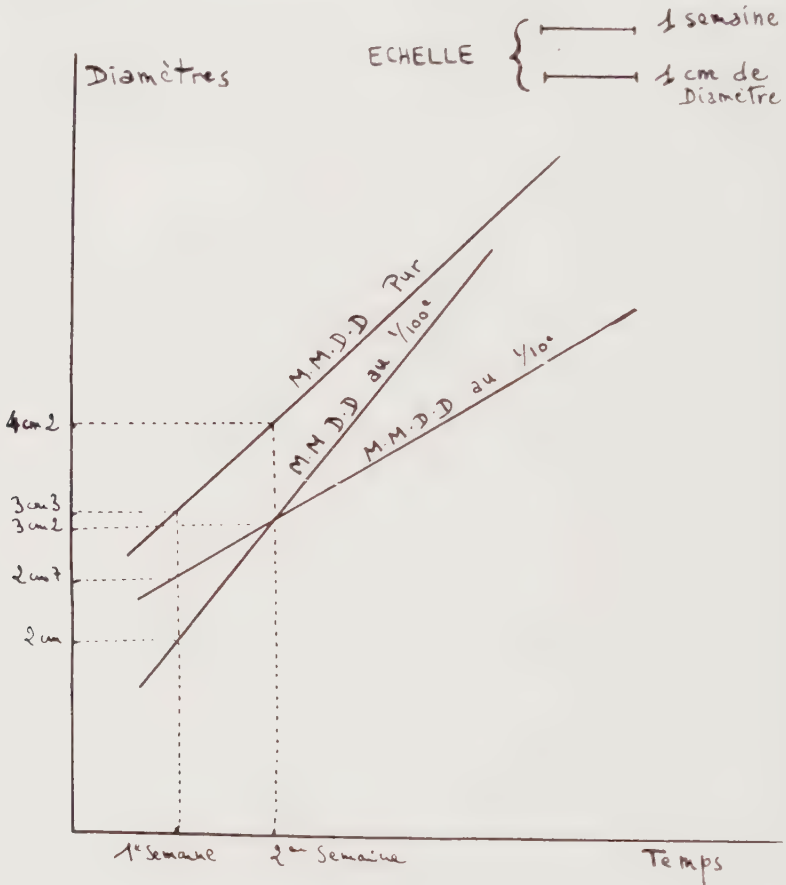
3 cm., 2 pour la Sol. de M.M.D.D. au 1/100^e

3 cm., 2 pour la Sol. de M.M.D.D. au 1/10^e

4 cm., 2 pour le M.M.D.D. concentré

On voit donc les progrès très nets accomplis par la diffusion du liquide en fonction du temps.

Ceci nous a conduit à établir des courbes montrant l'action comparative des diverses concentrations de M.M.D.D. par rapport au temps.



L'observation de ce graphique nous permet de remarquer que si la dilution au 1/100^e et la Solution concentrée ont, compte tenu de la différence d'activité qui existe entr'elles, des actions et des diffusions sensiblement comparables, la dilution au 1/10^e, par contre, diffuse beaucoup moins vite, si bien qu'au bout de 15 jours cette concentration (1/10^e) et la solution au 1/100^e présentent un « halo de Fongostase » identique (3 cm., 2).

La répétition de ces expériences nous a conduit, chaque fois, à des observations similaires.

INTERET DE CETTE METHODE

On voit donc tout le profit que l'on peut tirer de cette observation dans le domaine de la Phytopathologie et, spécifiquement, des affections d'origine cryptogamique :

1° - Dans tous les cas où la gravité de la situation ne néces-

sitera pas une médication d'urgence, massive, mais au contraire, où la menace de la maladie imminente demandera **un traitement de longue haleine**, lent et prolongé, on aurait donc intérêt à employer la solution de faible concentration qui, par un processus d'action plus doux, pénètre cependant plus vite et mieux.

2° - Par ailleurs, il est intéressant de noter que cette solution de faible concentration est également celle de **moindre toxicité**, ce qui diminue considérablement les risques d'accidents en cours de manipulation. Avantage dont l'intérêt n'échappera à personne, car, rappelons-le, ces Produits FONGICIDES sont destinés à être manipulés dans les campagnes par un personnel non spécialisé qui n'est pas toujours au courant des dangers auxquels il s'expose et des précautions qu'il conviendrait de prendre.

3° - Enfin, le dernier intérêt de cette Méthode est de constituer un véritable

« TEST DE DIFFUSION »

qui va nous permettre, en même temps que la mise en évidence du Pouvoir Fongicide, l'essai en Laboratoire du produit considéré, avant son utilisation pratique sur le terrain.

Mieux encore, si nous étions certains qu'il nous soit permis d'extrapoler du comportement du M.M.D.D. à travers la gélose, à son comportement « in vivo », nous serions tentés de proposer ce procédé pour la mesure de la vitesse de diffusion des diverses concentrations d'un produit considéré, de façon à déterminer avec précision la concentration convenable à employer dans chaque cas.

Mais, cette certitude n'étant pas acquise, nous ne pousserons pas aussi loin nos conclusions.

CONCLUSIONS

Ayant déjà, au fur et à mesure de chaque Chapitre, tiré la leçon de chaque expérience, nous serons très brefs en ce qui concerne les conclusions générales.

Notre but, rappelons-le, fut la mise au point d'un Test Biologique, pratique et facilement réalisable en Laboratoire, nous donnant une base de « normalisation » à laquelle nous rapporter. But qui, nous l'avons déjà dit, pour téméraire qu'il fût il y a une dizaine d'années, est devenu une nécessité à l'heure actuelle, en raison :

1° de la **multiplicité des Produits** qui s'avèrent avoir des Propriétés FONGICIDES ou FONGOSTATIQUES ;

2° de la **grande variété des Méthodes** employées jusqu'à ce jour pour les tester ou les doser.

Cet essai de Normalisation présente, en effet, un double intérêt :

A - En Agronomie, tout d'abord, où la standardisation des Tests de Contrôle et des Méthodes Biologiques de Dosage permettrait l'identification d'un produit inconnu ou l'appréciation qualitative et quantitative de la valeur d'un produit connu. Elle permettrait, dans des conditions de travail rigoureusement définies, de donner à l'action de ces composés chimiques sur les Cryptogames Saprophytes (symbiotes ou parasites des Végétaux), un indice qui tendrait vers une valeur absolue. La comparaison des Produits Phytopharmaceutiques entr'eux s'en trouverait grandement simplifiée.

B. - En Toxicologie ensuite, où l'une des premières préoccupations est la mise en évidence facile et rapide des Substances FONGICIDES toxiques qui, employées au cours de la culture, peuvent se retrouver dans les matières alimentaires. Tel est le cas, en particulier, des principes organo-mercuriels (inscrits au Tableau A), parmi lesquels nous avons choisi d'expérimenter le METHYL MERCURE DICYAN DIAMIDE, que nous avons appelé M.M.D.D.

C'est pourquoi nous avons entrepris un travail dont nous retraçons ici un rapide exposé. Nous dirons ensuite à laquelle de ces expériences vont nos préférences.

Diverses Méthodes employées

I. — TECHNIQUE METTANT EN ŒUVRE LES ESPECES SAPROPHYTES.

1. - Méthode des Dilutions en Milieu Liquide

Cette méthode met en jeu, **séparément** et **successivement**, les quatre souches de Champignons-Tests choisis et l'observateur note

leur comportement et leur résistance à l'action de doses croissantes de M.M.D.D.

Ces observations ont permis de déterminer avec précision la concentration de la Solution de M.M.D.D. qui s'avère FONGICIDE et FONGOSTATIQUE pour chacun des Champignons-Tests envisagés. A savoir :

RHIZOPUS NIGRICANS (Erh.) Mucoracées
ASPERGILLUS FLAVUS (V. Tiegh) Aspergillacées
PENICILLIUM ROQUEFORTI (Thom) Aspergillacées
ALTERNARIA SOLANI (E. et M.) Hyphomycètes.

Cette première expérience nous permet de noter des différences notables de résistance aux agents Fongicides et Fongostatiques et de **classer** ces divers Champignons suivant leur vulnérabilité. Nous trouvons donc, par ordre de résistance croissante :

- 1° ALTERNARIA SOLANI (E. et M.)
- 2° RHIZOPUS NIGRICANS (Erh.)
- 3° ASPERGILLUS FLAVUS (V. Tiegh)
- 4° PENICILLIUM ROQUEFORTI (Thom).

2. - Méthode des Dilutions en Milieu Solide

Cette technique, qui n'était que le reflet en milieu solide de la précédente, eut pu nous donner des résultats appréciables si les difficultés du mode opératoire ne l'avaient rendue imprécise (pollution du milieu).

Nous nous contenterons donc de la considérer comme un contrôle de la précédente.

3. - Méthode personnelle inspirée des Techniques de Fleming et de Heatley

Cette méthode ne s'adresse plus comme les précédentes à des Champignons-Tests placés séparément et successivement en contact avec le Fongicide étudié. L'éventail des quatre Champignons choisis est ici **expérimenté dans son ensemble**.

Ensemencés en même temps, sur le même milieu, dans la même Boîte de Pétri, ils subissent de la part des conditions extérieures (température, humidité, durée de l'expérience) une même influence : l'évolution de leurs cycles vitaux est donc à tout moment **comparable**.

Dans chaque Boîte, le groupe de quatre Champignons est mis en contact avec des solutions de M.M.D.D. de concentrations différentes, placées au centre de la Boîte dans un tube de verre cylindrique appelé « Tube de Heatley ».

On peut ainsi noter et comparer à tout moment les différentes réactions de ces Champignons vis-à-vis du liquide FONGICIDE qui diffuse en déterminant autour du tube central ce que nous avons appelé un « halo de Fongostase ».

Les diverses observations faites, et notamment l'extraordinaire vitalité du *PENICILLIUM*, nous ont permis de confirmer avec certitude le CLASSEMENT de ces Champignons par ordre croissant de résistance aux agents FONGICIDES, que nous avons établi au cours de l'expérience des Dilutions en Milieu Liquide.

Mais le principal intérêt de cette Méthode réside dans le fait qu'elle nous permet d'arriver à la détermination de

L'Unité Fongicide

qui est, rappelons-le :

« La quantité, exprimée en grammes, de la **Substance Fongicide** qui, placée dans un tube de Heatley à raison de 1 cc. de la solution aqueuse, au centre d'une Boîte de Pétri contenant du MILIEU de RAULIN gélosé à 30 0/00 etensemencée à ses quatre pôles par le *PASPERGILLUS FLAVUS* (V. Tiegh), produit autour de lui, en 8 jours, un cercle d'inhibition de 4 cms de diamètre. Ceci à la température de 25° centigrades. »

Cette définition nous permet de mettre au point un DOSAGE du POUVOIR FONGICIDE. Résultat qui, on le voit, est bien dans l'ordre d'idées de nos préoccupations de Normalisation.

Notons enfin que cette Méthode permet également, mais avec moins de précision, la détermination de **L'Unité Fongostatique** et le DOSAGE du POUVOIR FONGOSTATIQUE.

II. — TECHNIQUE METTANT EN ŒUVRE UN CHAMPIGNON ANAEROBIE (FORME LEVURE).

1. - Méthode des Dilutions en Tubes (Milieu liquide)

Cette méthode s'adresse à la LEVURE de BIERE ou *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*ensemencée en tubes à essai, sur Moût de Bière, à la température de 8° centigrades.

Son but primordial est la mise en évidence du Pouvoir Fongicide par inhibition, pour une concentration donnée, de la prolifération des cellules levures, prolifération dont la mesure nous est donnée :

— par un dégagement de CO_2 décelable à la cloche à gaz, et traduisant l'intensité de la fermentation ;

— par l'opacité du milieu, appréciable par néphélémétrie, et traduisant la multiplication des cellules.

Contrairement à ce que nous avons espéré tout d'abord, cette technique ne permet pas d'arriver à un Dosage, la mesure néphélémétrique nécessitant, pour être précise, une homogénéité de milieu impossible à réaliser avec des cellules Levures.

2. - Méthode inspirée de la Technique de Heatley

On opère ici en Milieu Solide où, après plusieurs essais préliminaires, nous avons choisi d'ensemencer la LEVURE de BOULANGERIE ou *SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS* (Hans).

L'expérience consiste, dans plusieurs séries de Boîtes de Pétriensemencées, à déterminer autour du Tube de Heatley central des

«halos de fongostase » dont le diamètre varie avec le temps (diffusion), et en fonction de la concentration de la solution de M.M.D.D. contenue dans les tubes.

Ces diverses mesures, faites avec précision et à intervalles réguliers, permettent d'établir un graphique dont la lecture nous renseigne sur la rapidité de diffusion des diverses dilutions étudiées.

Cette technique constitue donc un véritable TEST de DIFFUSION qui permettra peut-être d'induire, en Laboratoire, de l'action future du Produit employé sur le Végétal lui-même.

Ce Test de Diffusion pourrait donc aider, dans une certaine mesure, au choix de la Solution convenable à employer « in situ », compte tenu de sa toxicité, de sa vitesse de diffusion et des exigences de la maladie cryptogamique à traiter.

Arrivés au terme de cet exposé, il nous faut conclure. Parmi les différentes Méthodes expérimentées au cours de notre travail, deux d'entr'elles retiennent particulièrement notre attention.

Ce sont :

1° - La dernière Méthode exposée, celle qui s'adresse à la FORME LEVURE (SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS), en milieu solide (Raulin Neutre gélosé). Cette Méthode permet la mise au point d'un

« TEST DE DIFFUSION »

des Solutions FONGICIDES, ainsi que l'établissement d'un GRAPHIQUE (procédé d'expression toujours clair et bref), traduisant la progression de cette diffusion par rapport au temps ;

2° - La Méthode III, inspirée des Techniques de FLEMING et de HEATLEY. L'intérêt de cette Méthode est d'expérimenter simultanément en milieu solide (Raulin Neutre gélosé), quatre Souches de Champignons Saprophytes, espèces courantes, poussant bien sur milieux de culture usuels.

Le principal intérêt de cette technique est de s'appliquer non pas à l'étude de l'évolution individuelle de chaque espèce, mais à la comparaison de leurs cycles vitaux progressant concurremment.

De plus, cette Méthode nous offre la possibilité d'établir la définition de

L'UNITE FONGICIDE

et par là même, d'arriver à un DOSAGE de l'ACTIVITE FONGICIDE.

C'est, en définitive, cette dernière technique qui semble correspondre le mieux au but que nous nous étions proposé : la mise au point d'un Test Biologique de Normalisation des Substances FONGICIDES et FONGOSTATIQUES de Synthèse.

Vu et approuvé.

Pour le Doyen,

L'assesseur :

DELPHAUT

Lu :

Le Président du Jury :

PELLISSIER

Vu et permis d'imprimer

Aix, le 14 Mai 1954

Le Recteur :

BLACHE

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- 1 — Association professionnelle de la Phytopharmacie : 1952, **12**, p. 56.
- 2 — BUSTINZA-LACHIONDO : « *Les antibiotiques antimicrobiens et la Pénicilline* », Oreste Zeluck, Edit., Paris, 1946, p. 134 et 185.
- 3 — III^e Congrès International de Phytopharmacie: Paris, 1953, Vol. **I**, p. 68 à 71.
- 4 — Défense des Végétaux, 1953, **5**, p. 19.
- 5 — DONALD (E.H.) et FREAD : « *Chemistry of Insecticides, Fungicides and Herbicides* », Mac Graw-Hill Edit., New-York, 1949, p. 211.
- 6 — FRAZER (A. C.) : « *Pharmacologie des Produits Chimiques dans les denrées alimentaires* », Endeavour, 1953, Vol. **XII**, N^o **45**, p. 43.
- 7 — KEUFER (J.) et JANOT (M.-M.) : « *Mécanismes biochimiques des antibiotiques* », Masson Edit., Paris, 1953, p. 1 à 4.
- 8 — KIRBY (A.H.M.) et FRICK (E. L.) : « *The Glass-slide germination test as a simple, precise tool for toxicity studies with Venturia S. P.* », Recueil des Résumés des Communications présentées au III^e Congrès International de Phytopharmacie 1952, Communication **97**, p. 28.
- 9 — LANGERON (M.) : « *Précis de Mycologie* », Masson Edit, Paris, 1945, p. 439.
- 10 — LANGERON (M.) : « *Précis de Micrographie* », Masson Edit., Paris 1943, p. 1.233.
- 11 — LEBEAU et COUTOIS : « *Traité de Pharmacie Chimique* », Masson Edit., Paris, 1946, **3**, p. 3.181 à 3.198.
- 12 — LUTERAAN et GUYOJANNIN : « *Procédé de culture sur lames* », Revue de mycologie, 1952, **17**, p. 158.
- 13 — WANDELS (G. R.) et DARBY (R. T.) : « *A rapid cell volume assay for fungitoxicity using fungus spores* », Journal of Bacteriology, 1953, Vol. **65**, N^o **1**, p. 16 à 36.
- 14 — MASON, BROWN et MINGA : « *Rapports entre l'action Fongicide et la constitution chimique* », Phytopathology, 1951, **41**, p. 164 à 171.
- 15 — PAYEN (H.) et BREBION (H.) : « *Examen de quelques méthodes d'essai préliminaire des produits destinés aux traitements anticryptogamiques* », Recueil des Résumés des Communications présentées au III^e Congrès International de Phytopharmacie, 1952, Communication **113**, p. 29.
- 16 — PHYTOMA 1950, Revue de Phytomédecine appliquée, 1950, **12**, p. 29.
- 17 — RAUCOURT (M.) et SAYEGH (D.) : « *Les Fongicides Organiques de Synthèse* », Phytoma, 1952, N^o **38**, **39** et **41**.
- 18 — STUBBS (J.) : « *Greenhouse methods of evaluating foliage fungicides* », Recueil des Résumés des Communications présentées au III^e Congrès International de Phytopharmacie, 1952, Communication N^o **93**, p. 28.
- 19 — VAILLE (Ch.) et STERN (G.) : « *A propos de quelques intoxications récentes* », Revue d'hygiène et de Médecine sociale, 1953, N^o **5**, p. 443.
- 20 — VIGNA (A.) : « *Thèse de Doctorat en Pharmacie* », Marseille, 1949, p. 58 à 70.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	9
DEFINITIONS	10
CHAPITRE I.....	12
LES SUBSTANCES FONGICIDES ET FONGOSTA- TIQUES DE SYNTHÈSE	12
I. — L'activité fongicide, ses rapports avec la formule chimique. Nomenclature des prin- cipaux dérivés utilisés	12
II. — Méthodes actuelles de caractérisation et de mesure des Fongicides	19
OBJET DU TRAVAIL	22
CHAPITRE II	24
METHODES METTANT EN ŒUVRE DES ESPECES SAPROPHYTES	24
I. — Méthode des dilutions en milieu liquide ..	25
Milieu de culture	25
Technique expérimentale	25
Contrôle de cette méthode	26
Résultats	27
Interprétation	27
Intérêt pratique de cette méthode	28
II. — Méthode des Dilutions en Milieu Solide ..	29
Technique expérimentale	29
Inconvénients	30
Résultats	30

	Pages
III. — Méthode personnelle inspirée des techniques de Fleming et de Heatley	31
Expérience de Fleming	31
Expérience de Heatley	32
Exposé de la méthode	33
Technique expérimentale	34
Résultats obtenus	35
Interprétation	37
Observation	37
Unité Fongicide et Dosage	39
Unité Fongostatique et Dosage	40
CHAPITRE III	42
METHODES METTANT EN ŒUVRE LA FORME LEVURE	42
I. — Méthodes des dilutions en tubes	42
Technique expérimentale	42
Conclusion	43
II. — Méthode inspirée de la Technique de Heatley	44
Choix de la Levure et du milieu de culture	44
Technique expérimentale	45
Résultats	45
Intérêt de cette méthode	46
CONCLUSIONS	48
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	53
TABLE DES MATIÈRES	55
